PRD2009-17

Projet de décision d'homologation

Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et biofongicide liquide Integral™

(also available in English)

Le 30 décembre 2009

Ce document est publié par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec :

Section des publications
Agence de réglementation de
la lutte antiparasitaire
Santé Canada
2720, promenade Riverside
I.A. 6605C
Ottawa (Ontario) K1A 0K9

Internet : pmra.publications@hc-sc.gc.ca
santecanada.gc.ca/arla
Télécopieur : 613-736-3758
Service de renseignements :
1-800-267-6315 ou 613-736-3799
pmra infoserv@hc-sc.gc.ca

Canada

SC pub : 091205

ISBN : 978-1-100-93348-1 (978-1-100-93349-8)
Numéro de catalogue : H113-9/2009-17F (H113-9/2009-17F-PDF)

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de Santé Canada, 2009

Tous droits réservés. Il est interdit de reproduire ou de transmettre l'information (ou le contenu de la publication ou du produit), sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, reproduction électronique ou mécanique, photocopie, enregistrement sur support magnétique ou autre, ou de la verser dans un système de recherche documentaire, sans l'autorisation écrite préalable du ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0S5.

Table des matières

Aperçu 1
Projet de décision réglementaire concernant le biofongicide liquide Integral™ 1
Sur quoi se fonde Santé Canada pour prendre sa décision réglementaire? 1
Que sont la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et le biofongicide liquide Integral™? 2
Considérations relatives à la santé 2
Considérations relatives à l'environnement 4
Considérations relatives à la valeur 5
Mesures de réduction des risques 5
Prochaines étapes 6
Autres renseignements 6
Évaluation scientifique 7
Biofongicide liquide Integral™ 7
1.0 La matière active, ses propriétés et ses utilisations 7
1.1 Description de la matière active 7
1.2 Propriétés physico-chimiques de la matière active et de la préparation commerciale 8
1.3 Mode d'emploi 8
1.4 Mode d'action 9
2.0 Méthodes d'analyse 9
2.1 Méthodes d'identification du microorganisme 9
2.2 Méthodes de détermination de la pureté de la souche 10
2.3 Méthodes de détermination de la concentration de microorganismes dans le produit destiné à la fabrication des préparations commerciales 10
2.4 Méthodes d'identification et de quantification des résidus (viables ou non viables) du microorganisme actif et des métabolites pertinents 10
2.5 Méthodes d'analyse des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué 11
2.6 Méthodes pour démontrer l'absence de tout agent pathogène pour les êtres humains et les mammifères 11
2.7 Méthodes de détermination de la stabilité à l'entreposage et de la durée de conservation du microorganisme 11
3.0 Effets sur la santé humaine et animale 12
3.1 Résumé – toxicité et infectiosité 12
3.2 Évaluation des risques associés à l'exposition professionnelle et occasionnelle 15
3.2.1 Exposition professionnelle 15
3.2.2 Exposition occasionnelle 16
3.3 Évaluation des risques associés à l'exposition alimentaire 16
3.3.2 Eau potable 16
3.3.3 Risques alimentaires aigus et chroniques pour les sous-populations vulnérables 17
3.4 Limites maximales de résidus 17
3.5 Exposition globale 18
3.6 Effets cumulatifs 18
4.0 Effets sur l'environnement 18
4.1 Devenir et comportement dans l'environnement 18
4.2 Effets sur les espèces non ciblées 20
4.2.2 Effets sur les organismes aquatiques 24
5.0 Valeur 25

5.1 Allégations d'efficacité acceptables 25
5.1.1 Répression des maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié du canola) causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp. au moyen de l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ seul 25
5.1.2 Suppression des maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié) causées par *Fusarium* spp. et *Rhizoctonia* spp. au moyen du mélange en cuve du biofongicide liquide Integral™ et du traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou de la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL 26
5.2 Phytotoxicité 26
5.4 Aspects économiques 26
5.5.1 Recensement des produits de remplacement 27
5.5.2 Compatibilité avec les pratiques actuelles de lutte antiparasitaire, y compris la lutte antiparasitaire intégrée 27
5.5.3 Renseignements sur l'acquisition, réelle ou potentielle, d'une résistance 27
5.5.4 Contribution à l'atténuation des risques et à la durabilité 28
6.0 Considérations relatives à la Politique sur les produits antiparasitaires 28
6.1 Considérations relatives à la Politique de gestion des substances toxiques 28
6.2 Produits de formulation et contaminants préoccupants pour la santé ou l'environnement 29
7.0 Sommaire 29
7.1 Méthodes d'analyse du microorganisme tel que fabriqué 29
7.1 Santé et sécurité les êtres humainses 29
7.2 Risques pour l'environnement 30
7.3 Valeur 31
8.0 Projet de décision réglementaire 31
Annexe I Tableaux et figures 35
Tableau 1 Toxicité et infectiosité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et de la préparation commerciale associée (biofongicide liquide Integral™) 35
Tableau 3 Critères d'effets toxicologique aux fins de l'évaluation des risques pour la santé associés au biofongicide liquide Integral™ 38
Tableau 4 Sommaire intégré de la chimie des résidus dans les aliments 38
Tableau 5 Aperçu de la chimie des résidus dans les aliments - Études sur le métabolisme et évaluation des risques 38
Tableau 6 Devenir et comportement dans l'environnement 38
Tableau 7 Toxicité pour les espèces non ciblées 39
Tableau 8 Autres produits homologués pour réprimer/supprimer *Rhizoctonia* et *Fusarium* sur les semis de canola 44
Tableau 9 Allégations d'utilisation proposées sur l'étiquette par le demandeur et commentaires sur leur acceptabilité 45
Références 47

Aperçu

Projet de décision réglementaire concernant le biofongicide liquide Integral™

L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) de Santé Canada, en vertu de la *Loi sur les produits antiparasitaires* et de ses règlements d'application, propose l'homologation complète de la matière active de qualité technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et du biofongicide liquide Integral™, qui contient cette souche comme matière active, à des fins de vente et d'utilisation pour traiter des semences de canola contre les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié) causées par *Fusarium* spp. et *Rhizoctonia* spp.

D'après une évaluation des renseignements scientifiques à sa disposition, l'ARLA juge que, dans les conditions d'utilisation approuvées, le produit a de la valeur et ne pose pas de risque inacceptable pour la santé les êtres humainse ou l'environnement.

Le présent aperçu décrit les principaux points de l'évaluation, tandis que l'évaluation scientifique offre des renseignements techniques détaillés sur la valeur de la matière active de qualité technique, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et du biofongicide liquide Integral™ ainsi que sur leurs effets sur la santé humaine et l'environnement.

Sur quoi se fonde Santé Canada pour prendre sa décision réglementaire?

L'objectif premier de la LPA est d'éviter que l'utilisation de produits antiparasitaires n'expose les personnes ou l'environnement à des risques inacceptables. L'ARLA considère que les risques pour la santé ou l'environnement sont acceptables[1] s'il existe une certitude raisonnable que l'exposition au produit ou l'utilisation de celui-ci, dans les conditions d'homologation proposées, n'entraînera aucun effet nocif pour la santé humaine, les générations futures ou l'environnement. La Loi exige aussi que les produits aient une valeur[2] lorsqu'ils sont utilisés conformément au mode d'emploi figurant sur leur étiquette. Ces conditions d'homologation peuvent comprendre l'ajout de mises en garde particulières sur l'étiquette d'un produit précis en vue de réduire davantage les risques.

Pour en arriver à une décision, l'ARLA se fonde sur des politiques et des méthodes d'évaluation des risques rigoureuses et modernes. Ces méthodes consistent notamment à examiner les caractéristiques uniques des sous-populations vulnérables chez les êtres humains (par exemple, les enfants) et chez les organismes présents dans l'environnement (par exemple, ceux qui sont les plus vulnérables aux contaminants environnementaux). Ces méthodes et ces politiques

---

1 « Risques acceptables » tels que définis au paragraphe 2(2) de la *Loi sur les produits antiparasitaires*.

2 « Valeur » telle que définie au paragraphe 2(1) de la *Loi sur les produits antiparasitaires* : « L'apport réel ou potentiel d'un produit dans la lutte antiparasitaire, compte tenu des conditions d'homologation proposées ou fixées, notamment en fonction : *a*) de son efficacité; *b*) des conséquences de son utilisation sur l'hôte du parasite sur lequel le produit est destiné à être utilisé; *c*) des conséquences de son utilisation sur l'économie et la société de même que de ses avantages pour la santé, la sécurité et l'environnement. »

consistent également à examiner la nature des effets observés et à évaluer les incertitudes associées aux prévisions concernant les répercussions des pesticides. Pour obtenir de plus amples renseignements sur la façon dont l'ARLA réglemente les pesticides, sur le processus d'évaluation et sur les programmes de réduction des risques, veuillez consulter la section des pesticides et de la lutte antiparasitaire dans le site Web de Santé Canada à santecanada.gc.ca/arla.

Avant de prendre une décision finale concernant l'homologation de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™, l'ARLA examinera tous les commentaires reçus du public en réponse au présent document de consultation[3]. Elle publiera ensuite un document de décision d'homologation[4], dans lequel elle présentera sa décision, les motifs de celle-ci ainsi qu'un sommaire des commentaires reçus sur le projet de décision d'homologation et les réponses qu'elle a apportées à ces commentaires.

Pour de plus amples détails sur les renseignements présentés dans cet Aperçu, veuillez consulter l'Évaluation scientifique du présent document de consultation.

Que sont la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et le biofongicide liquide Integral™?

La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* est un produit antiparasitaire microbien antagoniste des champignons pathogènes *Rhizoctonia* et *Fusarium* qui causent des maladies des plantules de canola. L'effet protecteur de *Bacillus subtilis* est principalement attribuable à l'exclusion compétitive des organismes pathogènes. La préparation commerciale Integral™ est un produit liquide de traitement des semences qui contient la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. Elle est principalement destinée à être utilisée en combinaison avec un fongicide classique de traitement des semences de canola.

Considérations relatives à la santé

Les utilisations approuvées de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™ peuvent-elles nuire à la santé humaine?

Il est peu probable que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* nuise à la santé si le biofongicide liquide Integral™ est utilisé conformément au mode d'emploi sur l'étiquette.

On peut être exposé à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* en manipulant et en appliquant le produit. Au moment d'évaluer les risques pour la santé, on prend en considération plusieurs facteurs clés : les propriétés biologiques du microorganisme (par exemple, formation de sous-produits toxiques), les déclarations d'incident, la

[3] « Énoncé de consultation » conformément au paragraphe 28(2) de la *Loi sur les produits antiparasitaires*.

[4] « Énoncé de décision » conformément au paragraphe 28(5) de la *Loi sur les produits antiparasitaires*.

pathogénicité ou la toxicité potentielle telle que déterminée dans les études toxicologiques, et les concentrations auxquelles des personnes pourraient être exposées comparativement à l'exposition à d'autres souches du microorganisme présentes naturellement dans l'environnement.

Les études toxicologiques sur des animaux de laboratoire décrivent les effets potentiels sur la santé découlant de l'exposition à de fortes doses afin de déterminer les risques de pathogénicité, d'infectiosité et de toxicité. Les essais d'exposition d'animaux de laboratoire à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* n'ont montré aucun signe de toxicité ou de pathogénicité notable.

Résidus dans l'eau et les aliments

Les risques alimentaires associés à la consommation d'aliments et d'eau potable **ne sont pas préoccupants.**

Dans le cadre du processus d'évaluation avant l'homologation d'un pesticide, Santé Canada doit s'assurer que la consommation de la quantité maximale de résidus qui pourrait demeurer sur un aliment lorsqu'un pesticide est utilisé conformément au mode d'emploi de l'étiquette ne présentera pas de préoccupation pour la santé humaine. Cette quantité maximale de résidus prévue est alors fixée comme limite maximale de résidus (LMR) en vertu de la *Loi sur les produits antiparasitaires* aux fins des dispositions en matière de falsification de la *Loi sur les aliments et drogues*. Santé Canada fixe scientifiquement les LMR afin de s'assurer de l'innocuité des aliments consommés par les Canadiens.

Les souches de *Bacillus subtilis* sont communes dans la nature et l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences contre des maladies fongiques des cultures ne devrait pas accroître significativement les densités naturelles de cette bactérie. Il devrait rester peu ou pas de *Bacillus subtilis* sur le canola au moment de la récolte, parce que le produit est appliqué aux semences. Quelques souches de *Bacillus subtilis* ont été isolées à partir d'échantillons d'aliments mis en cause dans des intoxications alimentaires; on a montré que ces souches peuvent produire une toxine d'une grande stabilité thermique semblable à une toxine produite par *Bacillus cereus*, un microorganisme pathogène d'origine alimentaire connu. La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* ne produit pas cette toxine. De plus, aucun effet de ce genre n'a été signalé pour ce microorganisme aux États-Unis, où il est homologué depuis 1994. Enfin, lorsqu'on a administré la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* à des rats par voie orale, on n'a observé aucun signe de toxicité ou de maladie.

Il n'est donc pas nécessaire de fixer une LMR pour la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. De même, la probabilité que ses résidus contaminent des réserves d'eau potable est négligeable, sinon nulle. L'exposition par voie alimentaire et les risques connexes sont donc minimes, voire inexistants.

Risques professionnels associés à la manipulation du biofongicide liquide Integral™

Les risques professionnels ne sont pas préoccupants si le biofongicide liquide Integral™ est utilisé conformément au mode d'emploi précisé sur l'étiquette, qui comprend des mesures de protection.

Les travailleurs qui utilisent le biofongicide liquide Integral™ peuvent être exposés à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* par contact cutané, contact oculaire ou par inhalation. C'est pourquoi l'étiquette précisera que ces travailleurs doivent porter des gants, un vêtement à manches longues, un pantalon long, des chaussettes et des chaussures. De plus, les personnes qui mélangent, chargent ou appliquent le produit doivent porter un respirateur approuvé par le NIOSH (muni d'un filtre N, P, R ou HE).

Pour ce qui est de l'exposition occasionnelle, on s'attend à ce qu'elle soit bien inférieure à celle que subissent les manipulateurs et les préposés au mélange et au chargement; on l'estime donc négligeable. Par conséquent, les risques pour la santé découlant d'une exposition occasionnelle ne sont pas préoccupants.

Considérations relatives à l'environnement

Que se passe-t-il lorsque le biofongicide liquide Integral™ pénètre dans l'environnement?

Les risques pour l'environnement ne sont pas préoccupants.

Les données sur le devenir de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans l'environnement indiquent que ce microorganisme des sols pourrait survivre dans des sols extérieurs dans des conditions favorables (c'est-à-dire type de sol, humidité, acidité et température), mais qu'avec le temps, l'abondance de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* devrait revenir à des valeurs naturelles.
Des études publiées ont fait état d'infections causées par d'autres souches de *Bacillus subtilis* chez des mammifères, des insectes terrestres et des végétaux. Toutefois, ces rapports sont peu nombreux malgré la grande quantité d'ouvrages publiés sur ce microorganisme et concernent des souches inhabituelles ou particulières dont la pathogénicité n'a pas été étudiée à fond. Aucun rapport de maladie associée à *Bacillus subtilis* chez les oiseaux, les lombrics, les abeilles domestiques, les invertébrés aquatiques, les algues et les végétaux aquatiques n'a été publié. En outre, les études portant sur les effets du *Bacillus subtilis* sur les oiseaux, les mammifères sauvages, les insectes terrestres, les lombrics et les microorganismes du sol ne mentionnent aucun effet nocif chez ces populations.

Considérations relatives à la valeur

Quelle est la valeur du biofongicide liquide Integral™?

Le biofongicide liquide Integral™ est un biofongicide à risque réduit qui, utilisé seul, peut réprimer la pourriture des semences, la fonte et la brûlure des semis ainsi que le pourridié du canola. On peut supprimer ces maladies en utilisant le biofongicide liquide Integral™ en combinaison avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL.

L'utilisation du biofongicide liquide Integral™, seul ou en combinaison avec un des traitements chimiques des semences couramment utilisés par les entreprises de semences au Canada, permet d'accroître de 5 à 10 % la densité des peuplements de canola. Parce que sa matière active est une bactérie, le biofongicide liquide Integral™ offre une répression des maladies des plantules qui persiste probablement jusqu'à la fin du développement des semis. Il s'agit du premier biofongicide homologué pour le traitement des semences de canola au Canada.

Mesures de réduction des risques

Les étiquettes apposées sur les contenants de pesticides homologués fournissent le mode d'emploi du produit. On y trouve notamment des mesures de réduction des risques visant à protéger la santé humaine et l'environnement. La Loi exige le respect absolu du mode d'emploi.

Voici les principales mesures que l'on propose d'inclure sur l'étiquette du biofongicide liquide Integral™ pour réduire les risques identifiés dans la présente évaluation.

Principales mesures de réduction des risques

Santé humaine

Puisque le développement de réactions allergiques chez les utilisateurs soumis à des expositions répétées de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* est préoccupant, toute personne qui manipule, mélange, charge ou applique le biofongicide liquide Integral™, ou qui nettoie ou répare du matériel ayant été en contact avec le produit, doit porter des gants imperméables, un vêtement à manches longues, un pantalon long et un masque filtrant la poussière ou les gouttelettes (numéro d'homologation MSHA/NIOSH préfixe TC-21C) ou un respirateur approuvé par le NIOSH muni d'un filtre N-95, R-95, P-95 ou HE).

Environnement

À titre de précaution générale, on ajoutera à l'étiquette des énoncés exigeant que les personnes manipulant le produit ne contaminent pas les sources d'eau potable ou d'irrigation ou les habitats aquatiques en nettoyant l'équipement ou en éliminant les déchets.

Prochaines étapes

Avant de prendre une décision définitive au sujet de l'homologation de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™, l'ARLA examinera tous les commentaires communiqués par le public en réponse au présent document de consultation. L'ARLA acceptera les commentaires écrits au sujet de la décision proposée pendant une période de 45 jours à compter de la date de publication du présent document.

L'ARLA publiera ensuite une décision d'homologation, dans laquelle elle présentera sa décision, les raisons de cette décision, un résumé des commentaires reçus concernant le projet de décision d'homologation et les réponses qu'elle a apportées à ces commentaires.

Autres renseignements

Lorsque l'ARLA prendra une décision finale sur la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et le biofongicide liquide Integral™, elle publiera une décision d'homologation (fondée sur l'évaluation scientifique présentée dans le présent document de consultation). En outre, les données d'essai mentionnées dans le présent document seront mises à la disposition du public, sur demande, dans la salle de lecture de l'ARLA (située à Ottawa).

Évaluation scientifique

Biofongicide liquide Integral™

1.0 La matière active, ses propriétés et ses utilisations

1.1 Description de la matière active

Microorganisme actif	Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*
Utilité	Biofongicide
Nom scientifique	Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*
Désignation taxinomique	
Règne	Eubactéries
Embranchement	Firmicutes
Ordre	Bacillales
Genre	*Bacillus*
Espèce	*subtilis*
Souche	MBI 600
Renseignements sur l'état des brevets	Brevets canadiens : i. 1324099 Délivrance : le 9 novembre 1993 Expiration : le 9 novembre 2010 ii. 1337935 Délivrance : le 16 janvier 1996 Expiration : le 16 janvier 2013
Pureté minimale de la matière active	$5{,}5 \times 10^{11}$ spores/g

Nature des impuretés d'importance toxicologique, environnementale et/ou économique	Le produit technique ne contient pas d'impureté ou de microcontaminant figurant sur la liste des substances de la voie 1 de la Politique de gestion des substances toxiques. Des études publiées ont montré que *Bacillus subtilis* produit de petits peptides et peptidolipides antibiotiques agissant principalement contre les bactéries Gram positives mais aussi contre les bactéries Gram négatives, les levures et les champignons. On retrouve notamment des peptidolipides intracellulaires (mycosubtiline), des peptidolipides cycliques extracellulaires (facteur *Aspergillus*, bacillomycine A/B/D/F/L/R/S, eumycine, fengycine, iturine A et toximycine) et des peptides cycliques extracellulaires (chaetomacine, fongistatine, mycobacilline et facteur *Rhizoctonia*). On signale une activité hémolytique pour certains peptidolipides. La souche MBI 600 produit aussi une protéine antibiotique de 63 kilodaltons dont l'activité a été démontrée contre les bactéries Gram positives et les champignons, mais pour laquelle aucune toxicité chez les mammifères n'a été relevée.

1.2 Propriétés physico-chimiques de la matière active et de la préparation commerciale

Produit technique, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et sa préparation commerciale le biofongicide liquide Integral™

Propriétés	Produit technique, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*	Biofongicide liquide Integral™
Couleur	*Beige-blanc*	*Beige-blanc*
Odeur	*Odeur de moisi*	*Odeur de moisi*
État physique	*Poudre mouillable*	*Liquide*
Garantie	$5,5 \times 10^{11}$ *spores/g*	$2,2 \times 10^{10}$ *spores/ml*
Masse volumique	$0,46\ g/cm^3 \pm 0,03\ g/cm^3$	*1,10 à 1,22 g/ml à 20 °C*

1.3 Mode d'emploi

Le biofongicide liquide Integral™ sert à traiter les semences de canola afin de réprimer les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié) causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp. En outre, le mélange en cuve du biofongicide liquide Integral™ avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL permet de supprimer ces maladies chez le canola.

On applique le biofongicide liquide Integral™ mélangé avec un produit chimique de traitement des semences de canola homologué au moyen d'un appareil commercial de traitement des semences. On ajoute d'abord la quantité requise du produit chimique, puis on ajoute lentement le biofongicide liquide Integral™ à la solution et on mélange jusqu'à ce que celle-ci soit homogène. La solution mélangée ne doit pas être conservée durant plus de 72 heures avant de l'appliquer à des semences.

La dose d'application est de 160 ml de biofongicide liquide Integral™ par 100 kg de semences, que le produit soit utilisé seul ou mélangé en cuve avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL aux doses indiquées sur l'étiquette. Si on l'utilise en combinaison, on ajoute d'abord la quantité requise du produit chimique, puis on ajoute lentement le biofongicide liquide Integral™ à la solution et on mélange jusqu'à ce que celle-ci soit homogène.

1.4 Mode d'action

La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* colonise rapidement les racines, s'établissant sans tarder sur les semences et à la surface des racines où il supplante les pathogènes fongiques racinaires potentiels. De plus, lorsqu'on cultive la souche MBI 600 dans un milieu limité en nutriments, la bactérie produit in situ une nouvelle protéine antifongique active contre divers pathogènes racinaires (notamment *Fusarium* spp. et *Rhizoctonia* spp.), ce qui peut aussi contribuer à son mode d'action.

2.0 Méthodes d'analyse

2.1 Méthodes d'identification du microorganisme

L'identification à l'espèce de *Bacillus subtilis* se fait au moyen des trousses commerciales API 20E et API Rapid CH. L'identification de la souche a été effectuée par réactions en chaîne de la polymérase et séquençage de l'ADN du produit des réactions en chaîne de polymérase à l'aide d'amorces de l'ARNr 16S suivi d'une recherche BLAST de la séquence, laquelle a identifié l'isolat comme *Bacillus subtilis*. On se sert aussi d'un simple test d'étalement sur gélose pour confirmer la morphologie des colonies de l'agent microbien de lutte antiparasitaire (AMLA).

Pour distinguer la souche MBI 600 des autres souches de *Bacillus subtilis*, on peut recourir à la chromatographie sur gel pour déterminer le poids moléculaire de la protéine antibiotique caractéristique de la souche MBI 600. Ce poids moléculaire est environ trois fois plus élevé que celui des isolats classiques de *Bacillus subtilis*. On effectue également un essai de diffusion sur gélose pour vérifier l'activité du métabolite propre à la souche.

2.2 Méthodes de détermination de la pureté de la souche

Des spores de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sont mises en suspension dans une solution aqueuse de 10 % de glycérol et conservées à -80 °C dans une pièce à atmosphère contrôlée exclusivement affectée à la préparation de solutions mères. On échantillonne l'inoculant et on détermine s'il est contaminé par d'autres bactéries en examinant la morphologie des colonies sur des plaques de gélose nutritive standard. On entrepose de multiples aliquotes des cultures mères de la souche MBI 600 dans deux congélateurs affectés exclusivement à cette fin. Les solutions mères sont identifiées par un numéro de lot et la date à laquelle le contenant a été mis dans le congélateur pour la première fois.

2.3 Méthodes de détermination de la concentration de microorganismes dans le produit destiné à la fabrication des préparations commerciales

D'abord, on vérifie régulièrement la concentration de l'AMLA dans le produit technique qu'est la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et le biofongicide liquide Integral™ en dénombrant les colonies obtenues par inoculation de dilutions successives des échantillons sur des plaques de gélose nutritive après 16 à 20 heures d'incubation à 37 °C, puis encore une fois après incubation durant une seconde nuit. Cette méthode permet de détecter *Bacillus subtilis* sous forme de cellules végétatives et d'endospores.

En second lieu, les propriétés antibiotiques de l'AMLA sont confirmées au moyen d'un essai de diffusion sur gélose : on met la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* en culture sur des plaques de gélose nutritive à 37 °C et le lendemain on recouvre les colonies de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* d'un milieu Sabouraud contenant *Botrytis cinerea*, puis on incube le tout à 18 °C durant quatre jours. On mesure ensuite les halos d'inhibition dans le milieu Sabouraud : un rayon de 2 cm ou plus confirme que l'isolat est bien la souche MBI 600.

2.4 Méthodes d'identification et de quantification des résidus (viables ou non viables) du microorganisme actif et des métabolites pertinents

Bacillus subtilis est un microorganisme omniprésent dans la nature que l'on a isolé à partir d'un large éventail de milieux. L'utilisation de la souche MBI 600 pour traiter des semences ne devrait pas accroître de façon significative les concentrations naturelles de ce microorganisme dans l'environnement. Selon la United States Food and Drug Administration, certaines souches de *Bacillus subtilis* ont été isolées d'échantillons d'aliments mis en cause dans des intoxications alimentaires. Cependant, ces souches démontraient la capacité de produire une toxine d'une grande stabilité thermique qui pourrait être similaire à la vomitoxine produite par le *Bacillus cereus*, un microorganisme pathogène d'origine alimentaire connu. Selon les rapports, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* ne produit pas cette toxine. De plus, aucun effet de ce genre n'a été signalé pour ce microorganisme aux États-Unis, où il est homologué depuis 1994. En outre, on n'a constaté aucun effet toxique ou pathogène sur des rats à qui l'on avait administré la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* par voie orale. Par conséquent, aucune méthode n'est requise pour quantifier les résidus viables ou non viables de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*.

2.5 Méthodes d'analyse des impuretés pertinentes dans le produit fabriqué

Pendant la fabrication, plusieurs méthodes sont utilisées pour limiter la contamination microbienne du produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™. Ces méthodes comprennent l'utilisation de grandes quantités d'inoculant, l'inoculation à des températures élevées, des vérifications fréquentes de la pureté par mise en culture sur gélose, la stérilisation de tout le matériel et des milieux de culture et la désinfection du matériel de récupération.

Les procédures de contrôle de la qualité visant à limiter la contamination microbienne durant la fabrication du produit technique et du biofongicide liquide Integral™ sont acceptables. Des vérifications périodiques de la qualité relative à l'identification du *Bacillus subtilis* sont réalisées pendant le processus de fabrication par mise en culture sur des plaques et examen visuel de la morphologie des colonies pour déceler d'éventuelles colonies inhabituelles. Le produit final est aussi mis en culture sur gélose trypticase-soja pour déceler d'éventuels contaminants microbiens. Toutes les colonies bactériennes et fongiques sont purifiées et identifiées par des méthodes de typage classiques.

2.6 Méthodes pour démontrer l'absence de tout agent pathogène pour les êtres humains et les mammifères

Comme il est indiqué à la section 2.5, plusieurs méthodes sont utilisées pour limiter la contamination microbienne du produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™. Ces procédures comprennent de fréquentes vérifications de la pureté par culture sur gélose pour détecter la présence de toute colonie inhabituelle et pour vérifier la morphologie des colonies.

Des données d'analyse jugées acceptables sur les contaminants microbiens ont été soumises pour cinq lots du biofongicide liquide Integral™. L'analyse comprenait des essais standard conçus pour déceler la contamination par des levures et les bactéries coliformes *Staphylococcus* et *Salmonella.* Bien que le dépistage de microbes pathogènes précis ne fait pas partie du programme régulier de contrôle de la qualité, l'absence de microorganismes contaminants dans un grand nombre de lots représentatifs indique que le programme d'assurance de la qualité du fabricant est efficace pour limiter les microorganismes contaminants. Aucun autre essai de dépistage de microbes précis n'est requis pour assurer l'innocuité du produit.

2.7 Méthodes de détermination de la stabilité à l'entreposage et de la durée de conservation du microorganisme

On a évalué la viabilité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans la préparation commerciale Integral™ en évaluant la garantie en fonction du temps à diverses températures d'entreposage : la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* est restée viable à la teneur garantie dans les conditions d'entreposage (25 à 28 °C l'été; 10 à 15 °C l'hiver) dans le produit technique jusqu'à 27 mois et dans le biofongicide liquide Integral™ jusqu'à 19 mois.

3.0 Effets sur la santé humaine et animale

3.1 Résumé – toxicité et infectiosité

La revue des ouvrages publiés a révélé que d'autres souches de *Bacillus subtilis* ont été mises en cause dans un certain nombre de cas d'infections chez les êtres humains et ont été identifiées comme l'agent causal d'intoxications alimentaires. On a signalé chez des êtres humains des cas de cellulite postopératoire, de septicémie, de maladie respiratoire, d'endocardite et de pneumonie. Dans bon nombre de cas, l'association de *Bacillus subtilis* n'est pas assez forte pour qu'on l'identifie sans équivoque comme l'agent causal. De plus, le nombre d'infections présumées est extrêmement faible si l'on considère le nombre total de déclarations d'infections bactériennes. Bon nombre de ces cas concernaient des abus de médicaments ou des patients très affaiblis. Comme *Bacillus subtilis* est omniprésent dans l'environnement, on s'attend à le retrouver parfois en association avec d'autres microorganismes dans des cas d'infection. Seules les personnes traitées avec des médicaments immunodépresseurs semblent vulnérables à l'infection au *Bacillus subtilis*. Pour ce qui est des infections d'origine alimentaire, la United States Food and Drug Administration a signalé que certaines souches de *Bacillus subtilis* avaient été isolées d'aliments mis en cause dans des intoxications alimentaires. Cependant, ces souches démontraient la capacité de produire une toxine d'une grande stabilité thermique qui pourrait être similaire à la vomitoxine produite par *Bacillus cereus*, un microorganisme pathogène d'origine alimentaire connu. Selon les rapports, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* ne produit pas cette toxine. De plus, aucune maladie de ce genre n'a été signalée pour ce microorganisme aux États-Unis, où il est homologué pour utilisation sur les cultures depuis 1994, ni au Canada où il est homologué depuis 2007.

Chez les autres mammifères, *Bacillus subtilis* a été mis en cause dans des cas de mastite bovine et de troubles de la reproduction chez la chèvre. Dans le cas de la mastite bovine, on n'a pas pu exclure *Bacillus subtilis* comme agent causal. Chez les chèvres présentant des problèmes de reproduction, on a trouvé une corrélation entre des charges bactériennes élevées dans les vagins infectés et des symptômes cliniques. Cependant, *Bacillus subtilis* isolé des tissus infectés ne s'est pas avéré pathogène pour la souris blanche suisse.

Des rapports mentionnent que *Bacillus subtilis* produit de petits peptides et peptidolipides antibiotiques agissant principalement contre les bactéries Gram positives, mais aussi contre les bactéries Gram négatives, les levures et les champignons, notamment des peptidolipides intracellulaires (mycosubtiline), des peptidolipides cycliques extracellulaires (facteur *Aspergillus*, bacillomycine A/B/D/F/L/R/S, eumycine, fengycine, iturine A et toximycine) et des peptides cycliques extracellulaires (chaetomacine, fongistatine, mycobacilline et facteur *Rhizoctonia*). On rapporte une activité hémolytique pour certains peptidolipides.

L'ARLA a examiné en détail la base de données toxicologique sur la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. La base de données est complète (voir l'annexe I) et comprend les études toxicologiques *in vivo* sur des animaux de laboratoire (toxicité/pathogénicité aiguës par voie orale et par inhalation, infectiosité aiguë par voie intraveineuse, toxicité et irritation cutanées aiguës, sensibilisation cutanée et irritation oculaire) exigées pour l'évaluation des risques pour la

santé, études qui ont été effectuées en suivant des protocoles internationalement reconnus et les bonnes pratiques de laboratoire. Les demandes d'exemption ont été jugées acceptables en ce qui concerne la toxicité cutanée aiguë du biofongicide liquide Integral™ et l'irritation cutanée qu'il pourrait causer.

Les données sont d'une grande qualité scientifique, et la base de données est jugée adéquate pour caractériser la toxicité et l'infectiosité de l'AMLA et de la préparation commerciale.

Dans l'étude de pathogénicité/toxicité orale aiguës, aucune toxicité significative n'a été observée chez des rats CD après l'administration par gavage de 2×10^8 spores de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. L'AMLA a initialement été détecté dans les excréments, l'urine et le contenu gastro-intestinal des rats traités, et dans le sang des rats traités au jour 7, mais il était complètement éliminé des organes et des liquides au jour 22. Selon les résultats de cette étude, la souche MBI 600 est d'une faible toxicité chez le rat lorsqu'elle est administrée par voie orale.

Dans l'étude de pathogénicité/toxicité par inhalation, on a observé de la mortalité après l'administration intratrachéale de la souche MBI 600 à des doses allant de 3,3 à $3,7 \times 10^8$ spores viables par individu. Les symptômes cliniques observés étaient les suivants : horripilation, posture courbée, démarche anormale, léthargie, pâleur des extrémités, respiration accélérée, respiration haletante, collapsus, perte de poids corporel (p.c.), diminution du gain de p.c. et diminution de la température corporelle. Chez les rats survivants, des spores viables de l'AMLA ont initialement été récupérées dans le caecum, les excréments, l'urine, le sang et d'autres organes. Au jour 7, des spores viables étaient principalement récupérées dans la rate, le coeur et le foie des animaux traités et, au jour 21, c'est uniquement dans les excréments et le caecum des animaux traités que des spores viables ont été retrouvées. Bien que l'on n'ait pas obtenu de clairance complète, un schéma de clairance bien précis a été déterminé. La toxicité observée dans cette étude est conforme aux résultats d'autres études de toxicité aiguë par inhalation effectuées avec d'autres espèces de *Bacillus*, et elle peut être attribuée aux activités hémolytiques de certains métabolites produits par *Bacillus subtilis*. Pour atténuer les risques d'exposition par inhalation à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, les préposés au mélange, au chargement et à l'application de la préparation commerciale devront porter un masque antipoussière quand elles sont le plus susceptible d'être exposées au produit par inhalation, c'est-à-dire quand elles appliquent le produit à des semences ou manipulent les semences traitées.

Dans l'étude de l'infectiosité par voie intraveineuse, on n'a constaté aucune mortalité et aucun signe clinique de toxicité ou de pathogénicité chez des rats CD après l'injection intraveineuse d'au moins 10^7 spores de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans une solution physiologique saline. Après le traitement, on a initialement récupéré l'AMLA dans les excréments, l'urine, le sang et divers organes de tous les rats traités. Le nombre de microorganismes diminuait avec le temps et, au jour 21, on a seulement récupéré des spores dans le foie et la rate des rats traités. Un schéma précis de clairance a pu être établi. D'après les resultants de cette étude, il n'y a aucune preuve de pathogénicité observée chez le rats à la suite d'une injection intraveineuse de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* à une dose approximative de 10^7 UFC par animal testé.

Dans l'étude de toxicité cutanée aiguë, on n'a constaté aucune mortalité attribuable au traitement et aucun signe clinique de toxicité, à part un très léger érythème et un très léger œdème chez les lapins traités avec une suspension aqueuse de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* à une dose de 2 ml/kg p.c. sur environ 10 % de la surface corporelle.

Dans l'étude d'irritation oculaire, on n'a observé qu'une légère irritation de la conjonctive une heure après l'instillation de 0,1 ml d'une suspension de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans le sac conjonctival de l'œil droit de lapins néo-zélandais blancs. L'irritation s'était complètement résorbée au jour 4. La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* est très peu irritante pour les yeux, puisque la cote moyenne maximale (CMM) s'est chiffrée à 4,6/110 (aux jours 1, 2 et 3), et l'indice maximum d'irritation (IMI) à 6/110 aux jours 1 et 2.

Dans l'étude de sensibilisation cutanée, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* a provoqué une réaction de sensibilisation chez des cobayes albinos après deux traitements d'induction avec l'AMLA dans l'eau et dans une solution 50:50 d'adjuvant complet de Freund et d'eau. Puisque, comme la plupart des microorganismes, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* contient des substances qui provoquent des réactions d'hypersensibilité chez des êtres humains, on le considère comme un sensibilisant potentiel. Par conséquent, les mots indicateurs « SENSIBILISANT POTENTIEL » doivent figurer sur les aires d'affichage principales des étiquettes du produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™, et les étiquettes doivent inclure des mises en garde exigeant le port d'un équipement de protection individuelle et la manipulation prudente du produit afin de réduire l'exposition des travailleurs.

Le fabricant a présenté une justification à l'appui de sa demande d'exemption de la présentation d'une étude de toxicité cutanée et d'une étude d'irritation cutanée sur le biofongicide liquide Integral™. L'ARLA a accepté la demande pour les raisons suivantes : non-toxicité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans l'étude de toxicité cutanée de la matière active de qualité technique; faible toxicité et non-pathogénicité de l'AMLA par voies orale, respiratoire et intraveineuse; absence d'effet nocif sur les travailleurs qui fabriquent et utilisent la préparation commerciale aux États-Unis depuis 1994; utilisation prévue dans des installations commerciales de traitement des semences dotées d'un système de transfert fermé; non-toxicité et utilisation très répandue des produits de formulation de la préparation commerciale.

Le profil de toxicité observé dans les études de niveau 1 (toxicité/infectiosité aiguë par voies orale, respiratoire et intraveineuse) ne nécessite pas d'études de niveau supérieur sur la toxicité subchronique et chronique.

La matière active, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, n'est pas reconnue pour être pathogène chez l'être humain ni pour perturber le système endocrinien. Aucune étude publiée ne laisse croire que *Bacillus subtilis* peut nuire au système endocrinien des animaux. Les études présentées sur la toxicité et l'infectiosité chez les rongeurs indiquent qu'après exposition par voie respiratoire ou orale, le système immunitaire demeure intact et est en mesure de réagir face à l'AMLA et de l'éliminer. D'après le poids de la preuve des données dont on dispose, on ne prévoit aucun effet nocif de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur le système endocrinien ou immunitaire.

3.2 Évaluation des risques associés à l'exposition professionnelle et occasionnelle

3.2.1 Exposition professionnelle

Les préposés à l'application, au mélange et au chargement qui manipulent le produit conformément au mode d'emploi peuvent y être exposés, principalement par contact avec la peau, les yeux et par inhalation, le contact cutané étant la principale source d'exposition. Puisque la peau intacte fait office de barrière naturelle contre la pénétration des microbes dans l'organisme humain, l'absorption cutanée ne peut survenir qu'en présence de lésions cutanées ou si le microorganisme est un agent pathogène doté de mécanismes de pénétration ou d'infection de la peau, ou encore, si des métabolites susceptibles d'être absorbés par la peau étaient produits. *Bacillus subtilis* n'a toutefois pas été défini comme un agent pathogène lorsqu'il se trouve en présence de lésions cutanées, et rien n'indique qu'il peut pénétrer la peau intacte de personnes en bonne santé. De plus, les études ont montré que l'AMLA est peu toxique et ne provoque qu'une irritation cutanée minime.

Il existe un risque de toxicité pour les personnes exposées par inhalation à de grandes quantités de spores de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. On peut aussi s'attendre à ce qu'elles développent une hypersensibilité respiratoire avec l'exposition répétée au produit. Il est donc nécessaire d'inscrire sur l'étiquette des avertissements précis afin de réduire au minimum l'exposition aux poussières du produit sec lors de sa manipulation et de son application. Pour réduire le risque d'exposition par inhalation, les préposés au mélange, au chargement et à l'application de la préparation commerciale devront porter un masque antipoussière quand elles sont le plus susceptibles d'être exposées au produit par inhalation.

L'ARLA part du principe que tous les microorganismes contiennent des substances qui peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité, peu importe les résultats obtenus lors des épreuves de sensibilisation. Les énoncés sur l'étiquette (notamment « sensibilisant cutané ») et les mesures d'atténuation des risques comme le port d'un équipement de protection individuelle - gants, vêtement à manches longues, pantalon « long », appareil respiratoire approuvé par le NIOSH (doté d'un filtre N95, P-95, R-95 ou HE), chaussures et chaussettes - est requis pour réduire au minimum les risques d'exposition et protéger les préposés qui manipulent le produit, soit les plus susceptibles d'être exposées.

3.2.2 Exposition occasionnelle

L'exposition du public par inhalation ou par voie cutanée devrait être faible dans le cas du traitement de semences de canola au biofongicide liquide Integral™ qui se fera à l'intérieur. L'ARLA estime que, globalement, l'exposition occasionnelle ne posera aucun risque inutile étant donné le profil peu toxique et peu pathogène de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et de la préparation commerciale.

L'étiquette de la préparation commerciale précise que le produit ne doit pas être appliqué sur les gazons en plaque, et les aires résidentielles ou récréatives. Le risque d'exposition cutanée occasionnelle des adultes, des nourrissons et des enfants est donc faible. Comme le produit est utilisé en contexte agricole, l'exposition des nourrissons et des enfants dans les écoles, les résidences et les garderies sera probablement très faible à inexistante. Par conséquent, on s'attend à ce que le risque pour la santé des nourrissons et des enfants soit négligeable.

3.3 Évaluation des risques associés à l'exposition alimentaire

3.3.1 Aliments

Comme le biofongicide liquide Integral™ ne sera appliqué qu'aux semences à l'intérieur, l'exposition alimentaire par les produits alimentaires tirés des cultures de semences traitées devrait être très faible. Par ailleurs, il est peu probable que l'exposition à l'AMLA par voie alimentaire pose un risque indu pour les consommateurs, car aucun effet nocif n'a été signalé aux doses de risque maximal dans l'étude de toxicité aiguë par voie orale de niveau I présentée. De plus, *Bacillus subtilis* est omniprésent dans la plupart des milieux terrestres.

Le profil de toxicité observé dans les études de niveau 1 (toxicité/infectiosité aiguës par voies orale, respiratoire et intraveineuse) ne nécessite pas d'études de niveau supérieur sur la toxicité subchronique et chronique. Les risques chroniques associés à l'exposition alimentaire pour la population générale et les sous-populations vulnérables, comme les nourrissons et les enfants, ne sont donc pas préoccupants.

3.3.2 Eau potable

On considère qu'il est très peu probable que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* atteigne des milieux aquatiques par lessivage dans le sol à partir de semences traitées au biofongicide liquide Integral™. Étant donné que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* n'est généralement pas reconnue comme un microorganisme aquatique, elle ne devrait pas proliférer dans les milieux aquatiques à la suite de son application directe ou indirecte (par exemple, lessivage) à des plans d'eau. En outre, on ne considère pas que *Bacillus subtilis* constitue un risque pour l'eau potable. D'ailleurs, *Bacillus subtilis* ne fait pas partie des indicateurs potentiels de contamination microbienne ou de pathogénicité directe recherchés dans le cadre de la surveillance de l'eau potable. La percolation dans le sol et le traitement de l'eau potable par les municipalités réduisent tous deux la possibilité d'un transfert significatif de résidus à l'eau potable. De plus, l'étiquette du biofongicide liquide Integral™ précisera que les utilisateurs doivent éviter de

contaminer les sources d'eau potable ou les habitats aquatiques lors du nettoyage de l'équipement ou de l'élimination des déchets. Par conséquent, le potentiel d'exposition à cet AMLA par l'eau potable et les risques connexes sont probablement minimes, voire inexistants.

3.3.3 Risques alimentaires aigus et chroniques pour les sous-populations vulnérables

Il n'est habituellement pas possible de calculer des doses aiguës de référence (DARf) et des doses journalières admissibles (DJA) pour prédire les effets aigus et à long terme des agents microbiens sur la population générale ou les sous-populations potentiellement vulnérables, particulièrement les nourrissons et les enfants. La méthode de la dose unique (dose de risque maximal) dans les essais sur les AMLA est suffisante pour effectuer une évaluation générale raisonnable du risque si aucun effet nocif significatif (c'est-à-dire, aucun critère d'effet toxicologique préoccupant en matière de toxicité, d'infectiosité ou de pathogénicité aiguës) n'est constaté dans les essais de toxicité et d'infectiosité aiguës. Étant donné l'information disponible et les données existant sur les risques, l'ARLA conclut que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* présente une faible toxicité et n'est ni pathogène ni infectieuse pour les mammifères et que les nourrissons et les enfants ne sont sans doute pas plus vulnérables à cet AMLA que la population en général. Ainsi, il n'y a pas d'effets de seuil préoccupants et il n'est donc pas nécessaire d'effectuer des études approfondies (doses multiples) ou d'appliquer des facteurs d'incertitude pour tenir compte de la variabilité au sein d'une même espèce et entre les espèces, des facteurs de sécurité ou des marges d'exposition. Enfin, de nombreuses études ne s'appliquent pas pour cet AMLA. On peut citer l'analyse détaillée des profils de consommation alimentaire des nourrissons et des enfants, l'étude de la vulnérabilité particulière des nourrissons et des enfants aux effets de l'AMLA (y compris les effets neurologiques de l'exposition prénatale ou postnatale) et l'étude des effets cumulatifs de l'AMLA et d'autres microorganismes homologués ayant le même mécanisme de toxicité sur les nourrissons et les enfants. Pour ces raisons, l'ARLA n'a pas utilisé de méthode fondée sur la marge d'exposition (marge de sécurité) pour évaluer les risques associés à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* pour la santé humaine.

3.4 Limites maximales de résidus

Dans le cadre du processus d'évaluation avant l'homologation d'un pesticide, Santé Canada doit s'assurer que la consommation de la quantité maximale de résidus qui pourrait demeurer sur un aliment lorsqu'un pesticide est utilisé conformément au mode d'emploi de l'étiquette ne présentera pas de préoccupation pour la santé les êtres humainse. Cette quantité maximale de résidus prévue est alors fixée comme LMR en vertu de la *Loi sur les produits antiparasitaires* aux fins des dispositions en matière de falsification de la *Loi sur les aliments et drogues*. Santé Canada fixe scientifiquement les LMR afin de s'assurer de l'innocuité des aliments consommés par la population canadienne.

L'utilisation du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences ne devrait entraîner aucune augmentation soutenue des concentrations de fond de cet organisme. Bien que la United States Food and Drug Administration a relevé que certaines souches de *Bacillus subtilis* avaient été isolées à partir d'aliments mis en cause dans des intoxications alimentaires, on a démontré que ces souches peuvent produire une toxine d'une grande stabilité thermique semblable qu'on

n'a cependant pas trouvée chez la souche MBI 600. Aucune maladie de ce genre n'a été signalée pour cet AMLA aux États-Unis, où il est homologué pour utilisation sur les cultures depuis 1994, ni au Canada où il est homologué depuis 2007. Il n'est donc pas nécessaire de fixer une LMR pour la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* en vertu de la *Loi sur les produits antiparasitaires*.

3.5 Exposition globale

D'après les données expérimentales soumises sur la toxicité et l'infectiosité et les autres renseignements pertinents dont dispose l'ARLA, on peut conclure avec une certitude raisonnable que l'exposition globale aux résidus de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* ne posera aucun risque pour la population canadienne en général, y compris les nourrissons et les enfants, pourvu que cet AMLA soit utilisé pour traiter des semences conformément au mode d'emploi figurant sur l'étiquette. L'exposition globale regroupe toutes les expositions alimentaires prévues (aliments et eau potable) et toute autre exposition non professionnelle (par contact cutané et par inhalation) pour lesquelles il existe des données fiables. Même si l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ causait une augmentation de l'exposition à ce microorganisme, il ne devrait pas y avoir d'augmentation du risque pour la santé les êtres humainse.

3.6 Effets cumulatifs

L'ARLA a examiné les données existantes concernant les effets cumulatifs des résidus de l'AMLA et d'autres substances ayant un mécanisme de toxicité semblable, y compris les effets cumulatifs sur les nourrissons et les enfants. L'ARLA n'a pas connaissance d'autres microorganismes ou substances qui ont un mécanisme de toxicité semblable à celui de cet AMLA, outre les souches de *Bacillus subtilis* naturellement présentes dans l'environnement ainsi que le biofongicide Subtilex™ et le ProMix™ avec biofongicide, qui contiennent également la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* comme matière active. On ne prévoit pas d'effets cumulatifs si des résidus de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* interagissent avec des souches apparentées de cette espèce microbienne.

4.0 Effets sur l'environnement

4.1 Devenir et comportement dans l'environnement

Les essais sur le devenir dans l'environnement visent à démontrer si l'AMLA est capable de survivre ou de se multiplier dans le milieu où il est appliqué. Ces essais pourraient fournir des indications sur le type d'organisme non ciblé susceptible d'être exposé et sur l'étendue de cette exposition. Les données sur le devenir dans l'environnement (niveaux II et III) ne sont normalement pas requises au niveau I; elles deviennent nécessaires lorsqu'on observe d'importants effets toxicologiques chez des organismes non ciblés dans les essais de niveau I.

Le demandeur n'a présenté aucune étude portant sur le comportement et le devenir dans l'environnement de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, mais il a présenté certaines données sur le devenir dans l'environnement de *Bacillus subtilis* dans le cadre de l'analyse documentaire

sur *Bacillus subtilis* et pour étayer ses demandes d'exemption de présentation de données de toxicologie environnementale.

Des espèces de *Bacillus* sont communes dans le sol et dans la litière végétale où elles jouent un rôle important dans le cycle biologique du carbone et de l'azote. D'autres milieux comme l'eau douce, l'eau de mer polluée, les sédiments des grands fonds marins, les aliments, le lait, les produits pharmaceutiques, etc., peuvent avoir acquis des bacilles provenant du sol par le biais du ruissellement, de la poussière et de matières végétales colonisées.

Le sol est considéré comme le principal habitat de la majorité des espèces de *Bacillus*. On a isolé *Bacillus subtilis* de différents types de sols dans diverses régions du monde, notamment en Australie, aux États-Unis, au Royaume-Uni, en Égypte, en Inde et en Allemagne. On a aussi isolé *Bacillus subtilis* de champs dans lesquels on cultivait des pommes de terre, des vignes et du riz. Dans une forêt de pins du Royaume-Uni, on a trouvé *Bacillus subtilis* principalement sous forme de cellules végétatives dans l'horizon minéral acide du sol, tandis que dans l'horizon minéral alcalin, il était présent principalement sous forme de spores. Les populations totales de *Bacillus subtilis* dans les horizons minéraux acide et alcalin étaient d'environ 7×10^4 UFC/g de poids sec de sol pour les deux horizons. Ces concentrations représentent approximativement 22 et 13 % de la population bactérienne totale des horizons acide et alcalin, respectivement. La proportion de cellules de *Bacillus subtilis* sous forme de spores dans les horizons acide et alcalin était de 32 et 81 %, respectivement.

On trouve aussi fréquemment *Bacillus subtilis* sur et dans les végétaux. Dans une étude portant sur les bactéries présentes sur les semences stérilisées en surface, on a trouvé des bacilles chez quatre espèces de mauvaises herbes dicotylédones (*Abutilon theophrasti*, *Datura stramonium*, *Ipomoea hederacea* et *Xanthium strumarium*) et dans le soja (*Glycine max*). On n'a pas pu établir de relation directe entre le pourcentage de semences comptant des bactéries et la proportion de semences déterminées comme étant viables pour une espèce en particulier. On a aussi isolé *Bacillus subtilis* des graines d'autres espèces végétales, comme le poivron/piment (*Capsicum annuum*) en Tunisie, le soja (*Glycine max*) aux États-Unis et en Éthiopie et le pois chiche (*Cicer arietinum*) en Éthiopie.

Des souches de *Bacillus subtilis* ont également été isolées de la rhizosphère et des parties aériennes de végétaux. On a isolé des souches de *Bacillus subtilis* de la rhizosphère d'œillets aux États-Unis, de plantules de café (*Coffea arabica*) en Inde, de la rhizosphère du colza en Allemagne et au Royaume-Uni, et de la surface des racines de pommier aux États-Unis. On a également isolé *Bacillus subtilis* de feuilles de géranium aux États-Unis, de la phyllosphère d'avocat (*Persea americana*) en Afrique du Sud, de cicatrices foliaires de pommiers au Royaume-Uni, du bois de vigne (*Vitis vinifera*) en Afrique du Sud, de l'érable rouge (*Acer rubrum*) et de l'érable argenté (*Acer saccharinum*) aux États-Unis, et de fruits de citrus (*Citrus reticulutu* et *Citrus sinensis*) en Australie.

Plusieurs études sur la persistance du *Bacillus subtilis* dans le sol ont montré qu'en général les populations des cultures introduites déclinent plus ou moins rapidement après leur introduction dans des sols naturels. Lorsqu'elles sont introduites dans des sols qui contiennent déjà une flore microbienne naturelle, les populations de souches introduites de *Bacillus subtilis* vont vraisemblablement décliner à 1 % ou moins de la population des souches indigènes de *Bacillus subtilis* que le sol peut soutenir.

Une concentration initiale de $4{,}1 \times 10^5$ cellules végétatives/ml de *Bacillus subtilis* ajoutée à de l'eau de lac non stérilisée a rapidement chuté à 8 cellules végétatives/ml après incubation à 30 °C pendant 48 heures. Durant cette période, la densité des spores est demeurée stable entre 5 à 8 spores/ml, indiquant que les spores de *Bacillus subtilis* demeurent stables dans l'eau de lac, mais les cellules végétatives n'ont pas réussi à produire des spores dans ces conditions. Des résultats similaires ont été obtenus lors des essais portant sur *Bacillus subtilis* dans de l'eau de lac stérilisée. En outre, dans l'étude de toxicité sur la carpe exposée durant 30 jours (*Cyprinus carpio*; voir la section 4.2.2), la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* a survécu dans de l'eau de robinet déchlorée entre les périodes de renouvellement de trois jours, sans doute sous forme de spores.

Aucune étude sur la persistance en milieu marin ou estuarien n'est disponible, mais selon divers rapports, *Bacillus subtilis* a été isolé à partir du milieu marin, ce qui porte à croire qu'il y serait naturellement présent. *Bacillus subtilis* a été isolé d'échantillons de sédiments et d'eau de mer et a aussi été trouvé vivant en association avec des éponges, des ascidies et des coraux sans causer d'effets nocifs.

L'application proposée à l'intérieur du biofongicide liquide Integral™ pour traiter les semences de canola, suivie de la plantation à l'extérieur des semences traitées, ne devraient pas entraîner une hausse soutenue des populations de l'AMLA au-delà de celles des espèces de *Bacillus* qui vivent naturellement dans le sol.

4.2 Effets sur les espèces non ciblées

Le demandeur a présenté une étude de toxicité orale sur les oiseaux, des études de toxicité sur cinq espèces d'arthropodes terrestres et une étude de toxicité sur les végétaux terrestres afin de déterminer les risques associés à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* pour les organismes terrestres. Les risques pour les organismes aquatiques non ciblés ont été abordés dans une étude de toxicité pour les poissons d'eau douce. L'ARLA a accepté les demandes d'exemption concernant les autres exigences en matière de toxicologie environnementale. Les justifications de ces demandes s'appuyaient sur l'ubiquité du *Bacillus subtilis* dans le sol et l'eau, dont les populations n'augmenteront pas à la suite de l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ (appliqué à des semences par du personnel qualifié dans un milieu intérieur contrôlé), sur le profil de toxicité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* mis en évidence par des études sur des animaux de laboratoire et sur l'examen des études publiées qui a révélé quelques observations d'effets nocifs sur des organismes terrestres et l'absence d'effets nocifs des populations naturelles de *Bacillus subtilis* sur les organismes aquatiques.

4.2.1 Effets sur les organismes terrestres

L'utilisation proposée de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* pour traiter des semences pourrait entraîner l'exposition d'oiseaux à l'AMLA par voie orale puisque des oiseaux pourraient ingérer des aliments exposés à des semences traitées. La toxicité aiguë et la pathogénicité de l'AMLA pour les oiseaux ont été évaluées dans une étude sur le colin de Virginie (*Colinus virginianus)*. Trois groupes de colins de Virginie âgés de 21 jours, apparemment en bonne santé, ont reçu pendant cinq jours, par le jabot ou le proventricule, des doses quotidiennes de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* (concentré GUS 378, 4 000 mg/kg p.c./j), de métabolites hydrosolubles de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* (240 mg/kg p.c./j) ou de spores lavées de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* (3 680 mg/kg p.c./j) dans de l'eau désionisée; on a observé les sujets durant une période totale de 30 jours. Un quatrième groupe a reçu pendant cinq jours 10 ml/kg p.c./j d'eau désionisée, à titre de groupe témoin négatif. De plus, chaque groupe contenait aussi un oiseau non traité servant de témoin pour l'infectiosité. On n'a relevé aucune mortalité ni aucun signe de toxicité ou de pathogénicité attribuable au traitement pendant toute la durée de l'étude. À l'autopsie, on a constaté qu'une femelle ayant reçu les métabolites hydrosolubles et un mâle ayant reçu la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* présentaient des rates pâles ou hypertrophiées. Ces effets sur la rate peuvent être attribués à la réaction immunologique normale aux corps étrangers, mais ils peuvent aussi être attribués aux effets hémolytiques signalés de certains métabolites hydrosolubles produits par *Bacillus subtilis* (voir la section 3.1). L'absence d'effet sur la rate des oiseaux traités avec des spores lavées de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* corrobore la possibilité d'une activité hémolytique, mais, puisqu'un seul oiseau a été affecté dans chaque groupe traité avec la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et les métabolites hydrosolubles de la souche MBI 600 *Bacillus subtilis*, la cause exacte de ces effets demeure équivoque. Peu importe la cause sous-jacente, les effets sur la rate étaient très limités, même en conditions de risque maximal. Par conséquent, on estime que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, les métabolites hydrosolubles de la souche MBI 600 *Bacillus subtilis* et les spores lavées de la souche MBI 600 *Bacillus subtilis* sont peu toxiques et ne sont pas pathogènes pour le colin de Virginie.

La possibilité que l'AMLA nuise aux arthropodes terrestres non ciblés a été évaluée par trois études de toxicité : une sur l'abeille, une sur le ver à soie et une sur le coléoptère prédateur *Harmonia axyridis* (coccinelle), le neuroptère prédateur *Chrysoperla carnea* (chrysope verte) et l'acarien prédateur *Phytoseiulus persimilis*. Les études ont porté sur la poudre mouillable de qualité technique IK-1080 WP qui renferme la souche NCIM 12376 de *Bacillus subtilis*. Comme il s'agit de la souche qui a donné naissance à la souche MBI 600, les deux sont considérées équivalentes.

Dans l'étude sur l'abeille domestique *(Apis mellifera)*, les individus ont été exposés par voie alimentaire au produit IK-1080 à une concentration de 1×10^8 unités formatrices de colonie (UFC)/ml durant 48 heures, et la mortalité a été observée durant 20 jours. Aucun effet n'a été observé sur la mortalité des abeilles, celle-ci étant même plus élevée pour le groupe témoin (26,0 %) que pour le groupe traité (15,3 %). La concentration létale à 50 % (CL_{50}) sur 48 heures a été estimée à $> 1 \times 10^8$ UFC/ml.

L'étude sur le coléoptère prédateur *Harmonia axyridis* (coccinelle), le neuroptère prédateur *Chrysoperla carnea* (chrysope verte) et l'acarien prédateur *Phytoseiulus persimilis* a porté sur les effets de l'exposition à l'AMLA par voie alimentaire ou par contact. L'ARLA a jugé l'étude acceptable même si les périodes d'observation étaient beaucoup plus courtes que recommandées. En résumé, on a évalué la toxicité aiguë de l'AMLA par voie alimentaire pour des larves et des adultes de coccinelles en les exposant à la poudre mouillable IK-1080 à raison de $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments durant 24 heures (larves) ou 48 heures (adultes). On a observé la mortalité et la croissance (nombre d'adultes émergeants) durant dix jours, mais on n'a remarqué aucun effet important sur ces variables, tant chez les larves que chez les adultes. La CL_{50} pour la toxicité aiguë par voie alimentaire a été estimée à $> 1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments.

On a évalué la toxicité aiguë par contact de l'AMLA pour la chrysope verte (*Chrysoperla carnea*) en immergeant une fois ses œufs dans une solution de 1×10^9 UFC/ml d'IK-1080 WP et en comptant le nombre d'œufs qui étaient éclos trois jours plus tard. On a également exposé des larves à l'IK-1080 WP à une concentration de $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments durant 72 heures. On a observé la mortalité et la croissance (nombre d'adultes émergeants) durant 21 jours. Aucun effet important sur la mortalité ou l'émergence (croissance) des œufs ou des adultes de chrysope n'a été constaté. La CL_{50} pour la toxicité aiguë par contact (oeufs) a été estimée à $> 1 \times 10^9$ UFC/ml, et la CL_{50} pour la toxicité aiguë par voie alimentaire (adultes) a été estimée à $> 1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments.

On a évalué la toxicité aiguë par contact de l'AMLA pour l'acarien prédateur *Phytoseiulus persimilis* en exposant des adultes à des feuilles de haricot commun traitées au produit IK-1080 WP (1×10^9 UFC/ml) à une dose de 4 mg/cm^2, soit l'équivalent de $3,2 \times 10^9$ UFC/cm^2, durant 72 heures et en surveillant la mortalité sur une période d'observation de 72 heures. Bien qu'on ait observé une hausse de la mortalité dans le groupe esposé (12,5 %) par rapport au groupe témoin (2,5 %), l'ARLA ne s'attend pas à ce que l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences ait des effets nocifs sur les arthropodes, parce que cette étude portait sur un scénario d'exposition peu probable compte tenu du profil d'emploi prévu du biofongicide liquide Integral™.

L'étude de toxicité par voie alimentaire de 48 heures sur des larves de ver à soie a consisté à enduire des feuilles de mûrier d'une suspension de $1,66 \times 10^{10}$ UFC/ml d'IK-1080 WP (dans une solution de Tween 40) et d'en nourrir les larves durant deux jours. Après l'exposition de 48 heures, on a donné aux larves des feuilles non traitées et on les a observées quotidiennement durant environ 20 jours pour évaluer la mortalité, les signes de toxicité et la qualité des cocons. Aucun effet n'a été observé sur ces variables. La CL_{50} pour la toxicité aiguë par voie alimentaire a été estimée à $> 1,66 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Dans l'étude de toxicité et de pathogénicité chez les végétaux, des semences de *Glycine max* cultivar Asgrow A-3427 ont été traitées avec la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* à des doses correspondant à 10^7 et 10^5 spores viables par graine de semence. Les graines traitées (50) ont été séchées et puis incubées pendant huit jours à 30, 35 ou 40 °C dans des boîtes de germination Kimpack pour déterminer l'effet de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur l'apparence des plantules à l'aide d'une clé de classement mise au point par le United States Department of

Agriculture. Les semences non traitées et les semences traitées avec de l'eau ont été soumises au même régime, puis mises à germer. Le traitement avec la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* n'a eu aucun effet sur le nombre de plantules normales dans les conditions de cette étude. Le seul effet relevé est un effet dépendant de la température, soit une réduction du nombre de plantules normales à 35 °C comparativement à 30 °C, et l'absence de plantules normales à 40 °C dans tous les groupes de traitement. Des références fournies dans le rapport d'étude mettent en cause *Bacillus subtilis* dans des cas de pourriture des semences de soja. Ces rapports proviennent tous d'un même laboratoire qui ne disposait plus de cultures de *Bacillus subtilis* citées en référence dans les publications originales. Un représentant du laboratoire a indiqué que les cultures en cause étaient probablement l'espèce *Bacillus megaterium* au lieu de l'espèce *Bacillus subtilis*. Cette étude démontre que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* n'était ni pathogène ni toxique pour les semences de *Glycine max* cultivar Asgrow A-3427.

L'ARLA a accepté les demandes d'exemption des exigences relatives à la présentation d'une étude de toxicité par voie respiratoire pour les oiseaux, d'une étude de toxicité pour les mammifères sauvages et d'une étude de toxicité pour les invertébrés autres que les arthropodes sur la base des justifications suivantes. *Bacillus subtilis* est un microorganisme omniprésent dans le sol, et l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ pour traiter les semences de canola ne devrait pas accroître de beaucoup la population naturelle du microorganisme en milieu terrestre. En outre, le biofongicide liquide Integral™ est appliqué par du personnel qualifié dans un milieu intérieur contrôlé, et les semences traitées sont ensuite plantées à l'extérieur dans le sol. On s'attend donc à ce que l'exposition des organismes terrestres non ciblés à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* soit minime, en particulier l'exposition des oiseaux par voie respiratoire. Les études publiées ne font aucune mention d'effets nocifs des populations naturelles de *Bacillus subtilis* sur des oiseaux, mais des effets nocifs sur des mammifères ont été observés dans quelques études qui ont mis en cause *Bacillus subtilis* dans des cas de mastite chez des bovins et de troubles de la reproduction chez des chèvres. Aucun autre effet nocif sur des mammifères n'a été signalé malgré l'omniprésence du microorganisme dans l'environnement. De plus, les études sur le rat présentées à l'appui de la demande d'homologation et résumées à la section 3.1 indiquent que le produit n'est pas pathogène pour les rongeurs et qu'il est peu toxique pour la plupart des voies d'exposition aux concentrations représentant un risque maximal à l'exception de la voie respiratoire. La toxicité observée dans cette étude correspond aux résultats d'études d'exposition par voie respiratoire à d'autres espèces de *Bacillus* et pourrait être attribuable à l'activité hémolytique de certains métabolites produits par *Bacillus subtilis*. On ne prévoit cependant pas que le scénario d'exposition associé à l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ dans des installations commerciales de traitement des semences dotées d'un système de transfert fermé n'entraîne des effets nocifs de ce genre sur des mammifères non ciblés.

Quant aux lombrics et aux autres macroorganismes du sol, une étude a porté sur l'utilisation possible de la souche VM 132 *Bacillus subtilis* comme agent de lutte biologique contre le nématode cécidogène (*Meloidogyne incognita*) parasite de la tomate. En effet, les plants cultivés à partir de semences inoculées présentaient un nombre significativement inférieur de galles formées par les nématodes, mais le mode d'action n'a pas été élucidé, et la relation pathogène n'a pas été établie. Par contre, une autre étude publiée, dans laquelle 20 à 30 nématodes (larves de stade 4 ou jeunes adultes hermaphrodites) de l'espèce *Caenorhabditis elegans* ont été transférés de tapis d'*Escherichia coli* souche OP50 à des tapis de *Bacillus subtilis* souche PY79 incubés sur une gélose avec infusion coeur-cervelle à 25 °C, n'a montré aucune toxicité ou pathogénicité du *Bacillus subtilis* pour le nématode. *Bacillus subtilis* n'est généralement pas considéré comme un pathogène des invertébrés autres que les arthropodes.

Pour les autres microorganismes du sol, le demandeur n'a présenté aucune étude portant sur les risques associés à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. Ces données ne sont pas requises, même si le produit vise à lutter contre des microorganismes nuisibles, car, *Bacillus subtilis* étant une composante normale du sol, il ne devrait nuire ni à des espèces de microorganismes d'importance environnementale ou économique, ni à des processus biogéochimiques où interviennent des microorganismes.

D'après toutes les données disponibles concernant les effets de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur les organismes terrestres, on peut être raisonnablement certain que l'utilisation proposée du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences ne nuira pas aux oiseaux, mammifères sauvages, arthropodes, invertébrés autres que les arthropodes, végétaux et microorganismes non ciblés.

4.2.2 Effets sur les organismes aquatiques

Dans l'étude sur la toxicité et l'infectiosité de *Bacillus subtilis* pour les poissons d'eau douce, aucun signe de toxicité ou d'infectiosité attribuable au traitement n'a été constaté lorsqu'on a exposé des carpes (*Cyprinus carpio*) à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dilué dans l'eau à des concentrations nominales de $2,0 \times 10^6$ CFU/ml, de $2,0 \times 10^7$ CFU/ml et de $2,0 \times 10^8$ CFU/ml sous régime statique ou de renouvellement. Les dosages microbiologiques effectués sur l'eau utilisée montrent que l'AMLA demeure stable entre les renouvellements d'eau, probablement sous forme de spores (voir la section 4.1).

L'ARLA a accepté les demandes d'exemption des exigences relatives à la présentation d'études de toxicité sur les poissons estuariens et marins, les arthropodes aquatiques et les végétaux aquatiques sur la base des justifications suivantes. L'utilisation du biofongicide liquide Integral™ se limitera au traitement de semences dans des installations commerciales dotées d'un système de transfert fermé. Ce profil d'emploi réduit au minimum l'exposition directe des organismes aquatiques non ciblés. Comme le produit n'est pas destiné à être appliqué directement à des plans d'eau, la seule contamination prévue d'écosystèmes aquatiques serait indirecte, provenant du lessivage des semences traitées plantées dans le sol. Compte tenu des concentrations prévues de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur les semences traitées et la non-persistance des souches de *Bacillus subtilis* non indigènes introduites dans des sols qui

contiennent déjà une microflore naturelle (voir la section 4.1), on s'attend à ce que la quantité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* qui atteindra des milieux aquatiques par lessivage soit négligeable. Néanmoins, les propriétés biologiques de cet AMLA laissent croire que ses spores peuvent survivre dans les écosystèmes aquatiques (voir la section 4.1). Même si *Bacillus subtilis* est omniprésent dans la nature, on ne s'attend pas à ce qu'il représente un danger pour les organismes aquatiques étant donné l'absence dans les ouvrages publiés de constat de maladie ou d'autres effets nocifs associés à ce microorganisme chez des poissons ou d'autres organismes aquatiques. On a même étudié le potentiel probiotique de *Bacillus subtilis* chez de nombreux animaux, y compris la dorade royale (*Sparus aurata* L.) et la crevette tigrée (*Panaeus monodon*). Bien que ces études n'aient pas été précisément conçues pour évaluer la toxicité potentielle et la pathogénicité de *Bacillus subtilis*, elles n'ont montré aucun effet nocif évident.

D'après toutes les données disponibles concernant les effets de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur les organismes aquatiques non ciblés, on peut être raisonnablement certain que l'utilisation proposée du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences ne nuira pas à ces organismes. À titre de précaution générale, on ajoutera à l'étiquette des énoncés exigeant que les préposés qui manipulent le produit ne contaminent pas les sources d'eau potable ou d'irrigation ou les habitats aquatiques en nettoyant l'équipement ou en éliminant les déchets.

5.0 Valeur

5.1 Allégations d'efficacité acceptables

5.1.1 Répression des maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié du canola) causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp. au moyen de l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ seul

La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, c'est-à-dire la matière active du biofongicide liquide Integral™, inhibe efficacement la croissance de *Rhizoctonia* et de *Fusarium* en milieux liquide et solide. En outre, des extraits cellulaires de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sont aussi efficaces pour inhiber la croissance fongique, ce qui montre que le mode d'action du biofongicide liquide Integral™ dépend non seulement de la concurrence avec les champignons pathogènes pour l'obtention des ressources disponibles, mais aussi d'une action antibiotique directe. La majorité des données présentées montrent des niveaux d'efficacité significatifs, quoique faibles, du biofongicide liquide Integral™ contre les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié). Les évaluations de l'incidence et de la gravité des maladies ont présenté des différences significatives. Lorsqu'on a regroupé en une seule analyse les résultats des trois essais sur *Rhizoctonia* qui ont été présentés, le taux de levée hâtive était plus élevé pour les semences traitées au biofongicide liquide Integral™ que pour les semences témoins inoculées non traitées. On a observé une amélioration de 10 % de la levée des semences traitées au biofongicide liquide Integral™ par comparaison aux semences témoins inoculées non traitées. Dans les quatre essais en serre qui ont été présentés (deux sur *Rhizoctonia* et deux sur *Fusarium*), le traitement des semences au biofongicide liquide Integral™ a encore accru le taux de levée (hausses de 10 à 48 %) par rapport aux témoins non

traités. Globalement, les niveaux de réduction de la maladie observés pour l'application du biofongicide liquide Integral™ seul correspondent à la répression des maladies en question.

5.1.2 Suppression des maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié) causées par *Fusarium* spp. et *Rhizoctonia* spp. au moyen du mélange en cuve du biofongicide liquide Integral™ et du traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou de la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL

Dans des essais de terrain réalisés à plusieurs sites en 2007 et répétés en 2008, on a comparé l'efficacité du mélange en cuve du biofongicide liquide Integral™ et du traitement de semences liquide Helix avec l'efficacité du produit Helix appliqué seul. En 2007, le traitement des semences au mélange en cuve a donné des hausses de 8 % du taux de levée hâtive et de 4 % de la densité des tiges par rapport au traitement des semences au produit Helix XTra seul (moyennes des données de tous les sites), ce qui s'est traduit par une hausse du rendement de 31 kg/ha. En 2008, le traitement des semences au mélange en cuve a donné une hausse d'environ 11 % de la densité des tiges par rapport au traitement des semences au produit Helix XTra seul. En outre, les deux années, l'évaluation visuelle a montré que les plants de canola étaient plus vigoureux dans les parcelles où l'on avait planté des semences traitées au mélange en cuve.

5.2 Phytotoxicité

Dans tous les essais, les traitements au biofongicide liquide Integral™ n'ont eu aucun effet nocif préoccupant sur la croissance et le développement des cultures de canola par rapport aux témoins (semences non traitées ou traitées à un produit chimique). On n'a observé aucun signe visible de phytotoxicité ou de phytopathogénicité. D'après toutes les données présentées, l'application, aux doses figurant sur l'étiquette, du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences ne devrait avoir aucun effet phytotoxique ou phytopathogène, ni d'autre effet nocif, sur la croissance des cultures de canola.

5.4 Aspects économiques

Le demandeur a présenté l'analyse suivante (fondée sur des renseignements fournis par le Conseil canadien du canola) de la contribution économique prévue du biofongicide liquide Integral™. Les maladies des plantules de canola donnent souvent lieu à des peuplements réduits ou clairsemés ou à des peuplements de plants peu vigoureux et, en bout de ligne, à des rendements réduits qui causent d'importantes pertes financières pour les producteurs agricoles. Ceux-ci décident souvent de réensemencer, ce qui leur coûte cher en temps et en argent. Outre les coûts évidents du réensemencement (coûts des semences, du carburant et en temps), il faut tenir compte du coût du traitement chimique supplémentaire des semences puisque la plupart des semences de canola sont vendues prétraitées. Aux coûts directs du réensemencement, il faut ajouter le coût d'une éventuelle deuxième application d'herbicide et l'éventuelle perte de revenu causée par le rendement réduit attribuable à l'ensemencement tardif. En se fondant sur le prix du canola au moment de l'examen, on calcule que la hausse de rendement de 31 kg/ha observée dans les essais au champ se traduit par une hausse du revenu de 9,88 $ par hectare. On estime

que l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ sur seulement 10 % de la superficie totale des cultures de canola au Canada pourrait accroître les revenus des producteurs de 6,4 millions de dollars.

5.5 Durabilité

5.5.1 Recensement des produits de remplacement

La stratégie actuelle de gestion des maladies des plantules combine des pratiques de gestion agronomique et le traitement chimique des semences. Les pratiques de gestion comprennent la plantation de semences de qualité certifiées à une profondeur de 10 à 20 mm dans un sol ferme, humide et suffisamment fertilisé lorsque la température est supérieure à 10 °C afin d'assurer une germination rapide et vigoureuse. La rotation des cultures de canola avec des cultures autres que les crucifères comme des céréales (blé, orge) réduit aussi l'incidence des maladies. Le traitement des semences à des mélanges chimiques fongicides constitue le principal moyen auquel recourent les producteurs agricoles pour réduire l'impact des maladies des plantules. On estime actuellement à plus de 90 % l'intensité de traitement. Plusieurs produits de traitement chimique des semences sont actuellement homologués pour utilisation sur le canola, notamment le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL, mais aucun produit biologique n'est homologué pour lutter contre les maladies des plantules de canola.

5.5.2 Compatibilité avec les pratiques actuelles de lutte antiparasitaire, y compris la lutte antiparasitaire intégrée

Le biofongicide liquide Integral™ présente une bonne compatibilité avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL, il assure une excellente innocuité des semences et améliore la levée du canola et l'établissement des cultures. L'utilisation du biofongicide liquide Integral™ en combinaison avec un traitement chimique des semences offrira au producteur de canola un outil supplémentaire qui a un mode d'action différent pour combattre les maladies des plantules. Le biofongicide s'intègre bien à une stratégie de lutte intégrée contre ces maladies.

5.5.3 Renseignements sur l'acquisition, réelle ou potentielle, d'une résistance

Il n'y a pas de donnée disponible sur l'acquisition d'une résistance à la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans le biofongicide liquide Integral™. Compte tenu de son mode d'action, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* ne devrait pas susciter de résistance chez les populations visées. La souche MBI 600 colonise rapidement les racines, s'établissant sans tarder à leur surface et ne laissant pas de place aux pathogènes fongiques. Des peptides et protéines antifongiques produites *in situ* par cette bactérie contribuent probablement aussi à la répression des pathogènes des racines. Comme l'exclusion compétitive semble constituer le principal mode d'action contre les pathogènes fongiques, le risque que des souches résistantes apparaissent au sein des populations de *Rhizoctonia* et de *Fusarium* serait très faible, car les organismes ciblés ne développent généralement pas de résistance à ce mode d'action.

5.5.4 Contribution à l'atténuation des risques et à la durabilité

Le biofongicide liquide Integral™ est un produit antiparasitaire microbien dont le mode d'action est fondé sur l'inhibition et l'exclusion compétitives de *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp. sur les semences et les racines de canola. Il s'agit d'un produit biologique qui vise à offrir une protection supplémentaire contre les maladies des plantules de canola et qui, à titre de biopesticide microbien, est peu susceptible de nuire à la santé de la population et de l'environnement du Canada.

6.0 Considérations relatives à la Politique sur les produits antiparasitaires

6.1 Considérations relatives à la Politique de gestion des substances toxiques

La gestion des substances toxiques est encadrée par la Politique de gestion des substances toxiques du gouvernement fédéral, laquelle est fondée sur le principe de précaution et une approche préventive à l'égard des substances qui pénètrent dans l'environnement et qui pourraient causer des dommages à l'environnement ou affecter la santé les êtres humainse. La Politique oriente les décideurs et établit un cadre de gestion scientifique pour faire en sorte que les programmes fédéraux demeurent conformes à ses objectifs. Un des principaux objectifs de gestion consiste à éliminer de l'environnement les substances toxiques qui résultent surtout de l'activité les êtres humainse et qui sont persistantes et bioaccumulables. La Politique désigne ces substances sous le nom de substances de la voie 1.

Dans le cadre de l'examen de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, l'ARLA a tenu compte de la Politique de gestion des substances toxiques du gouvernement fédéral et a suivi sa directive d'homologation DIR99-03, *Stratégie de l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire concernant la mise en œuvre de la Politique de gestion des substances toxiques*. Elle a aussi examiné les microcontaminants dans le produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et les produits de formulation dans la préparation commerciale. L'ARLA en a conclu que :

> Le produit technique, la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, ne répond pas aux critères de la voie 1, car la matière active est un organisme biologique et qu'elle n'est donc pas assujettie aux critères utilisés pour définir la persistance, la bioaccumulation et les propriétés toxiques des produits antiparasitaires chimiques. Il n'y a pas non plus de produits de formulation, de contaminants ou d'impuretés présents dans la préparation commerciale qui répondraient aux critères de la voie 1. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences donne lieu à l'introduction de substances de la voie 1 dans l'environnement.

6.2 Produits de formulation et contaminants préoccupants pour la santé ou l'environnement

Le produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et la préparation commerciale biofongicide liquide Integral™ ne contiennent ni produit de formulation ni contaminant préoccupants pour la santé ou l'environnement figurant sur la *Liste des formulants et des contaminants de produits antiparasitaires qui soulèvent des questions particulières en matière de santé ou d'environnement*, publiée dans la Gazette du Canada, Partie II, volume 139, numéro 24, pages 2641 à 2643.

7.0 Sommaire

7.1 Méthodes d'analyse du microorganisme tel que fabriqué

L'ARLA juge que les données de caractérisation de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sont adéquates pour évaluer les risques que posent ces substances pour la santé les êtres humainse et l'environnement. Le produit a été pleinement caractérisé, et les spécifications sont corroborées par l'analyse d'un nombre suffisant de lots. Bien que le dépistage de microbes pathogènes précis ne fait pas partie du programme régulier de contrôle de la qualité, l'absence de microorganismes contaminants dans un grand nombre de lots représentatifs indique que le programme d'assurance de la qualité du fabricant est efficace pour limiter les microorganismes contaminants. Aucun autre essai de dépistage de microbes précis n'est requis pour assurer l'innocuité du produit.

Les données sur la stabilité à l'entreposage étaient suffisantes pour corroborer une durée de conservation du biofongicide liquide Integral™ d'au moins 19 mois à 4 à 30 °C.

7.1 Santé et sécurité les êtres humainses

Les études sur la toxicité et l'infectiosité aiguës présentées à l'appui de la demande d'homologation de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™ sont jugées suffisamment complètes pour rendre une décision concernant leur homologation.

La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* est peu toxique chez le rat lorsqu'il est administré par voie orale ou cutanée. On a observé une toxicité significative de l'AMLA administré par inhalation, mais il ne s'est révélé ni pathogène ni infectieux par voie respiratoire ou intraveineuse. La toxicité observée cadre bien avec les résultats d'études sur la toxicité par inhalation d'autres espèces de *Bacillus* (par exemple, *Bacillus thuringiensis*) et serait attribuable à une réaction toxicologique non spécifique à la très forte dose administrée ou à la présence possible de métabolites hémolytiques dans la préparation.

L'ARLA a accepté les demandes d'exemption de présentation de données sur la toxicité cutanée aiguë du biofongicide liquide Integral™ et l'irritation cutanée qu'il pourrait causer. La souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* présente une faible toxicité cutanée et ne cause qu'une irritation minimale de la peau et des yeux.

Une étude de sensibilisation cutanée a montré que *Bacillus subtilis* est un agent sensibilisant, on présume d'ailleurs que tous les pesticides microbiens sont des sensibilisants potentiels. L'exposition répétée à de fortes concentrations de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* pourrait entraîner des réactions allergiques chez certaines personnes. Par conséquent, l'ARLA exige que les mots indicateurs « SENSIBILISANT POTENTIEL » figurent sur les aires d'affichage principales des étiquettes du produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et du biofongicide liquide Integral™. Les mesures visant à réduire au minimum l'exposition des travailleurs comprendront le port de l'équipement de protection individuelle approprié (vêtement à manches longues, pantalon long, chaussures, chaussettes et gants) et d'un respirateur ou masque facial filtrant la poussière et les gouttelettes.

Comme *Bacillus subtilis* est un microorganisme indigène du sol, il est peu probable que l'utilisation proposée du biofongicide liquide Integral™ pour traiter des semences laisse des résidus sur des aliments destinés à la consommation les êtres humainse ou animale. Bien qu'on ait isolé certaines souches de *Bacillus subtilis* à partir d'aliments mis en cause dans des cas d'intoxications alimentaires, aucun cas de ce genre n'a été signalé pour l'AMLA aux États-Unis où son utilisation sur des cultures est homologuée depuis 1994. En outre, il a été montré lors d'études de niveau I sur la toxicité et l'infectiosité aiguës faisant intervenir une dose de risque maximal, que la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* n'était pas toxique par voie orale, ni pathogène, ni infectieuse par les voies pulmonaire et intraveineuse. Par conséquent, on prévoit que le risque associé aux résidus présents dans ou sur les produits agricoles sera négligeable, voire nul, pour l'ensemble de la population (y compris les nourrissons et les enfants) et les animaux. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de fixer une LMR pour la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*.

7.2 Risques pour l'environnement

Le demandeur a présenté suffisamment de renseignements et de données sur le devenir dans l'environnement et les effets écotoxicologiques pour appuyer l'homologation du produit technique, c'est-à-dire la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, et du biofongicide liquide Integral™ qui contient la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*.

Les études sur les effets environnementaux présentées pour évaluer les risques que pose la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* pour les organismes non ciblés montrent que l'AMLA n'est pas toxique ni pathogène pour les oiseaux, les poissons d'eau douce, les arthropodes terrestres et les graines de semence de végétaux terrestres. L'ARLA a jugé acceptables les demandes d'exemption de présentation de données sur les autres groupes d'organismes non ciblés, soit les mammifères, les invertébrés autres que les arthropodes, les poissons estuariens et marins, les arthropodes aquatiques et les végétaux aquatiques. Les justifications de ces demandes s'appuyaient sur l'ubiquité dans le sol et l'eau de *Bacillus subtilis*, dont les populations dans les milieux terrestres et aquatiques n'augmenteront pas significativement à la suite de l'application du biofongicide liquide Integral™ à des semences par du personnel qualifié dans un milieu intérieur contrôlé. L'analyse documentaire n'a révélé aucune déclaration d'effets nocifs des populations naturelles de *Bacillus subtilis* sur des organismes aquatiques, mais elle a révélé quelques observations d'effets nocifs possibles sur des organismes terrestres (soit un nématode

phytopathogène et certains animaux d'élevage), effets qui n'ont été ni corroborés ni étudiés en profondeur. D'après les résultats des études de toxicité/pathogénicité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* sur des animaux de laboratoire et l'ubiquité de *Bacillus subtilis* dans l'environnement, l'AMLA ne devrait pas présenter de risque pour les organismes terrestres ou aquatiques non ciblés.

À titre de précaution générale, l'étiquette du produit comprendra des énoncés standards qui interdiront aux préposés qui manipulent le produit de contaminer les sources d'eau d'irrigation et d'eau potable et les habitats aquatiques au biofongicide liquide Integral™.

7.3 Valeur

L'allégation de répression des maladies des plantules de canola par le biofongicide liquide Integral™ utilisé seul pour traiter des semences est corroborée. L'allégation de suppression de ces maladies par le mélange en cuve du biofongicide liquide Integral™ avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL est également corroborée.

8.0 Projet de décision réglementaire

L'ARLA de Santé Canada, en vertu de la *Loi sur les produits antiparasitaires* et de ses règlements d'application, propose l'homologation complète de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et du biofongicide liquide Integral™, qui contient cette souche comme matière active de qualité technique, à des fins de vente et d'utilisation pour traiter des semences de canola contre les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis ainsi que pourridié) causées par *Fusarium* spp. et *Rhizoctonia* spp.

D'après une évaluation des renseignements scientifiques à sa disposition, l'ARLA juge que, dans les conditions d'utilisation approuvées, le produit a de la valeur et ne pose pas de risque inacceptable pour la santé humaine ou l'environnement.

Liste des abréviations

µg	microgramme
AMLA	agent microbien de lutte antiparasitaire
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
CE_{50}	concentration efficace à 50 %
CL_{50}	concentration létale à 50 %
cm	centimètre
CMM	cote moyenne maximale
CSEO	concentration sans effet observé
DARf	dose aiguë de référence
DJA	dose journalière admissible
DL_{50}	dose létale à 50 %
DSENO	dose sans effet nocif observé
DSEO	dose sans effet observé
EPA	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
g	gramme
ha	hectare
IMI	indice maximum d'irritation
j	jour
kg	kilogramme
L	litre
LMR	limite maximale de résidus
LQ	limite de quantification
m.a.	matière active
ME	marge d'exposition
mg	milligramme
ml	millilitre
MSHA	Mine Safety and Health Administration
NCIM	National Collection of Industrial Microorganisms
NIOSH	National Institute of Occupational Safety and Health
°C	degré Celsius
p.c.	poids corporel
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
ppm	parties par million
sp.	espèce
spp.	espèces
TM	trademark
UFC	unité formatrice de colonies

Annexe I Tableaux et figures

Tableau 1 Toxicité et infectiosité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* et de la préparation commerciale associée (biofongicide liquide Integral™)

Type d'étude	Espèce, souche et doses	Résultats	Effets significatifs et commentaires	Référence
Toxicité aiguë et infectiosité de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*				
Toxicité aiguë et infectiosité par voie orale	Rat CD, 11/sexe, suspension de 1 % dans de l'eau distillée stérile (1,9 à 2,7 × 10^8 UFC/individu), sacrifices aux jours 2, 8 et 15. 5/sexe traités avec l'AMLA autoclavé, suspension de 1 % dans de l'eau distillée stérile, 20 ml/kg p.c.	DL_{50} > ~ 2 × 10^8 CFU/individu	Aucune mortalité. Légère diminution du gain de p.c. observée au jour 15 chez 2 mâles traités à l'AMLA et au jour 22 chez une femelle traitée à l'AMLA autoclavé. Récupération initiale de l'AMLA dans les excréments, l'urine et le contenu gastro-intestinal (estomac, intestin grêle et cæcum); au jour 7, récupération dans le sang; au jour 22, clairance complète de l'AMLA de tous les organes et liquides corporels. Aucune anomalie significative à l'autopsie. **FAIBLE TOXICITÉ ET AUCUNE PATHOGÉNICITÉ**	Numéro de l'ARLA 1623586
Toxicité aiguë et infectiosité par inhalation	Rat CD 16 mâles et 15 femelles : suspension de 1 % dans de l'eau distillée stérile, 3,2 à 3,7 × 10^8 UFC/ind. 1,2 ml/kg p.c., sacrifices aux jours 1, 2, 8 et 15 5/sexe traités avec l'AMLA autoclavé, suspension de 1 % dans de l'eau distillée stérile, 1,2 ml/kg p.c.	DL_{50} > ~3,5 × 10^8 UFC/individu	Entre les jours 2 et 4 de la période d'observation, mort de 5 des 16 mâles et de 3 des 15 femelles. Perte de p.c. observée chez tous les individus trouvés morts; pertes de p.c. ou faibles gains de p.c. observés chez des individus traités avec l'AMLA et l'AMLA autoclavé. Horripilation, posture courbée, démarche anormale, léthargie, pâleur des extrémités, respiration accélérée, collapsus, respiration haletante observés chez de nombreux rats traités avec l'AMLA et l'AMLA autoclavé. Diminution de température corporelle de 3 à 4 °C chez	Numéro de l'ARLA 1623587

Type d'étude	Espèce, souche et doses	Résultats	Effets significatifs et commentaires	
			tous les rats ayant reçu l'AMLA ou l'AMLA autoclavé. Après 24 h, les températures corporelles étaient revenues à la normale. Aucun signe macroscopique observé à l'autopsie. Récupération initiale de l'AMLA dans le cæcum, les excréments, l'urine, le sang et divers organes (cerveau, cœur, foie, reins, rate, ganglion lymphatiques) des individus traités; au jour 7, récupération de spores viables principalement dans la rate, le coeur et le foie des rats traités; au jour 21, récupération de spores uniquement dans les excréments et le cæcum des rats traités. **TOXIQUE, NON PATHOGÈNE**	
Infectiosité par injection intraveineuse	Rat CD, 13/sexe, 4,2 à 4,8 × 10^7 UFC/individu 5/sexe traités avec l'AMLA autoclavé, suspension de 1 % dans de l'eau distillée stérile, 3 ml/kg p.c	DL_{50} > 4,0 × 10^7 UFC/individu	Aucune mortalité. Aucun effet sur le gain en p.c. et aucun signe apparent de toxicité ou de pathogénicité liée au traitement. Aucune anomalie observée à l'autopsie. Diminution des températures corporelles de ~3 °C chez les rats traités après 24 h. Récupération de l'AMLA des excréments, de l'urine, du sang et de divers organes (principalement le foie et la rate) après l'injection, la quantité retrouvée diminuant au cours de la période d'étude. Au jour 22, récupération de l'AMLA dans le foie et la rate seulement. **AUCUNE PATHOGÉNICITÉ**	Numéro de l'ARLA 1623589
Toxicité et irritation cutanées aiguës	Lapin néo-zélandais blanc, 5/sexe, non dilué, 2 ml/kg p.c. (équivalant à environ	DL_{50} > 2 ml/kg p.c.	Un mâle est mort, mais cette mortalité n'était pas liée au traitement. Observation d'un très léger érythème ou	Numéro de l'ARLA 1623590

Type d'étude	Espèce, souche et doses	Résultats	Effets significatifs et commentaires	
	10^{10} UFC/kg p.c.) appliqué sur 10 % de la surface du corps.		œdème (stade 1) aux sites de traitement chez les individus survivants lors du retrait du timbre. L'irritation avait disparu au jour 3, soit 24 h après le retrait du timbre. **MINIMALEMENT IRRITANT; FAIBLE TOXICITÉ**	
Sensibilisation cutanée	Cobaye albinos **Induction** 10/sexe, injections intradermiques avec 0,1 ml a) d'adjuvant complet de Freund dilué dans un volume égal d'eau; b) de 5 % d'AMLA dans de l'eau; c) de 5 % d'AMLA dans un mélange 50:50 d'adjuvant complet de Freund et d'eau. Après une semaine, application topique de 0,4 ml de la suspension de l'AMLA pendant 48 h. **Provocation** Applications topiques de 0,2 ml d'AMLA non dilué et d'un mélange 50:50 d'AMLA et d'eau distillée sur des sites naïfs	SENSIBILISANT	24 h après le test de provocation, la plupart des individus manifestaient un érythème et un œdème bien définis (stade 2) (provocation avec AMLA à 100 %) et 14 individus sur 20 ayant reçu le mélange 50:50 d'AMLA et d'eau avaient des réactions similaires. Érythème modéré à grave (stade 3) chez 7 individus sur 20 après 48 h et chez 8 individus sur 20 après 72 h. Plus de la moitié des individus présentaient un œdème modéré (stade 3) à grave (stade 4) à 48 h et 72 h. Nécrose, plaques ou bordures nécrotiques observées chez 12 individus sur 20 à 48 h et chez 6 individus sur 20 à 72 h.	Numéro de l'ARLA 1623592
Irritation oculaire	Lapin néo-zélandais blanc, 6 femelles, 0,1 ml du produit technique sous forme de poudre (équivalant à 10^9 UFC/individu), dans le sac conjonctival de l'œil droit	CMM[1]=4,6/110 (24, 48 et 72 h) IMI[2] = 6/110 (24 h)	Après 1 h : légère rougeur et écoulement de la conjonctive (stade 1) constatés. Après 24 h : chémosis constaté (stade 1). Irritation disparue au jour 4. **MINIMALEMENT IRRITANT**	Numéro de l'ARLA 1623593

Toxicité aiguë et irritation - Biofongicide liquide Integral™				
Toxicité et irritation cutanées aiguës - préparation commerciale	Justification à l'appui d'une demande d'exemption (plutôt que les données exigées sur la préparation commerciale)	**DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**	L'ARLA a accepté la demande pour les raisons suivantes : non-toxicité du la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* dans l'étude de toxicité cutanée; faible toxicité et non-pathogénicité de l'AMLA par les voies orale aiguë, respiratoire et intraveineuse; absence d'effet nocif sur les travailleurs qui fabriquent et utilisent la préparation commerciale aux États-Unis depuis 1994 et au Canada depuis 2007; utilisation prévue dans des installations commerciales de traitement des semences de canola dotées d'un système de transfert fermé; non-toxicité et utilisation très répandue des produits de formulation de la préparation commerciale.	Numéros de l'ARLA 1623590 1623586, 1623587, 1622722, 1622723.

1 CMM = cote moyenne maximale

2 IMI = indice maximum d'irritation

Tableau 3 Critères d'effets toxicologique aux fins de l'évaluation des risques pour la santé associés au biofongicide liquide Integral™

Tableau 4 Sommaire intégré de la chimie des résidus dans les aliments

Tableau 5 Aperçu de la chimie des résidus dans les aliments - Études sur le métabolisme et évaluation des risques

Tableau 6 Devenir et comportement dans l'environnement

Tableau 7 Toxicité pour les espèces non ciblées

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Organismes terrestres				
Vertébrés				
Oiseaux Colin de Virginie	Orale aiguë	Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, 30 individus Métabolites hydrosolubles de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, 10 individus Spores lavées de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, 10 individus Eau déionisée, 10 individus	DL_{50} (30 jours) > 2,4 × 10^9 UFC/kg p.c. (ou 4 000 mg m.a./kg p.c./j) DL_{50} > 240 mg m.a./kg p.c./j) DL_{50} = 2,2 x 10^9 UFC/kg p.c. (ou 3 680 mg m.a./kg p.c./j) Aucun signe de toxicité ou de pathogénicité. Aucune mortalité. Aucun effet apparent sur le p.c. ou la consommation alimentaire par rapport aux témoins. À l'autopsie, rate pâle ou hypertrophiée observée chez une femelle ayant reçu les métabolites hydrosolubles et chez un mâle ayant reçu la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. **FAIBLE TOXICITÉ, NON INFECTIEUX**	Numéro de l'ARLA 1623596
	Inhalation Injection	Présentation d'une demande d'exemption s[illegible]ppuyant sur l'ubiquité dans l'environnement de *Bacillus subtilis*, dont les populations n'augmenteront pas significativement en raison de l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences et pour lequel l'exposition des oiseaux par voie respiratoire devrait être minime, sur l'absence d'observation d'effets nocifs des populations naturelles de *Bacillus subtilis* sur des oiseaux dans les études publiées et sur le profil de toxicité de l'AMLA dans les études sur des animaux de laboratoire. **DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**		Numéros de l'ARLA 1623597, 1623596

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Mammifères sauvages		Aucune étude ni demande d'exemption n'a été présentée. Étant donné l'ubiquité de *Bacillus subtilis* dans l'environnement, l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences ne devrait pas accroître significativement ses populations. Les études publiées rapportent peu d'observations d'effet nocif des populations naturelles de *Bacillus subtilis*; cette bactérie a toutefois été mise en cause dans des cas de mastite bovine et de troubles de la reproduction chez des chèvres. Aucun autre effet nocif n'a été signalé malgré l'ubiquité du microorganisme dans l'environnement. Les études de toxicité/infectiosité aiguë (voies orale, respiratoire, intraveineuse et cutanée) sur des rats indiquent une clairance complète ou un schéma précis de clairance de l'AMLA chez les mammifères. La toxicité n'a été observée que par la voie respiratoire, ce qui correspond à ce qu'on a observé pour d'autres espèces de *Bacillus*. On ne prévoit cependant pas que le scénario d'exposition associé à l'utilisation du biofongicide liquide Integral™ dans des installations de traitement des semences n'entraîne des effets nocifs de ce genre sur des mammifères non ciblés.		Numéros de l'ARLA 1623586, 1623587, 1623589, 1623590
Invertébrés				
Organismes terrestres – Arthropodes	Abeille domestique – Toxicité par voie alimentaire	IK-1080 WP de qualité technique, contenant 1×10^8 UFC/ml de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, 100 abeilles.	CL_{50} 48 h > 1×10^8 UFC/ml Aucun effet sur la mortalité des abeilles domestiques n'a été constaté durant la période d'observation de 20 jours. **FAIBLE TOXICITÉ**	Numéro de l'ARLA 1623602
	Coccinelle (*Harmonia axyridis*)- Toxicité par voie alimentaire	IK-1080 WP de qualité technique, contenant 1×10^9 UFC/ml de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*. Larves (n = 30) et adultes (n = 30) exposés (durant 24 et 48 heures, respectivement) à $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments; période d'observation de 10 jours	Aucun effet substantiel sur la mortalité ou l'émergence (croissance) des larves ou des adultes. CL_{50} (toxicité aiguë par voie alimentaire) > $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments. Même si la période d'observation était beaucoup plus courte que les 21 à 30 jours recommandés, l'étude est jugée acceptable. **ÉTUDE ACCEPTABLE**	Numéro de l'ARLA 1623603

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Arthropodes terrestres (suite)	Chrysope verte (*Chrysoperla carnea)* - Toxicité par contact et toxicité par voie alimentaire	IK-1080 WP de qualité technique, contenant 1×10^9 UFC/ml de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* Exposition par contact : œufs (n = 30) trempés une fois dans une solution de 1×10^9 UFC/ml et exposition alimentaire : larves (n = 30) exposée durant 72 heures à $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments; période d'observation de 21 jours	Aucun effet substantiel sur la mortalité ou l'émergence (croissance) des œufs ou des adultes. CL_{50} (toxicité aiguë par contact pour les œufs) > 1×10^9 UFC/ml CL_{50} (toxicité aiguë par voie alimentaire) > $1,5 \times 10^5$ UFC/mg d'aliments. **ÉTUDE ACCEPTABLE**	Numéro de l'ARLA 1623603
	Acarien prédateur (*Phytoseiulus persimilis)* - Toxicité par contact	IK-1080 WP de qualité technique, contenant 1×10^9 UFC/ml de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* Adultes (n = 40) exposés durant 72 heures à des feuilles de haricot commun traitées à une dose de 4 mg/cm^2 (équivalant à $3,2 \times 10^9$ UFC/cm^2); période d'observation de 72 heures.	Hausse de la mortalité observée pour le groupe traité (12,5 % par comparaison à 2,5 %). Même si la période d'observation était beaucoup plus courte que les 21 à 30 jours recommandés, l'étude est jugée acceptable. **ÉTUDE ACCEPTABLE**	Numéro de l'ARLA 1623603

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Arthropodes terrestres (suite)	Larves de ver à soie - Toxicité par voie alimentaire	IK-1080 WP de qualité technique, contenant $8,3 \times 10^{11}$ UFC/g de la souche MBI 600 de *Bacillus subtilis* Larves (n = 100) nourries de feuilles de mûrier enduites d'une suspension de $1,66 \times 10^{10}$ UFC/ml de la substance à l'essai; période d'observation d'environ 20 jours. Groupe témoin non traité : eau distillée et Tween 40. Groupe témoin positif : Thuricide WP contenant le *Bacillus thuringiensis*	Aucun effet sur la mortalité ou la qualité des cocons. CL_{50} (toxicité aiguë par voie alimentaire) > $1,66 \times 10^{10}$ UFC/ml. **ÉTUDE ACCEPTABLE**	Numéro de l'ARLA 1623604
Invertébrés autres que les arthropodes	Toxicité aiguë - lombric	Présentation d'une demande d'exemption s'appuyant sur l'ubiquité dans l'environnement de *Bacillus subtilis*, dont les populations n'augmenteront pas significativement en raison de l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences; une étude publiée indique qu'une souche de *Bacillus subtilis* pourrait servir d'agent de lutte biologique contre le nématode cécidogène (*Meloidogyne incognita*) parasite de la tomate, mais le mode d'action n'a pas été élucidé, et la relation pathogène n'a pas été établie, tandis qu'une autre étude n'a montré aucune toxicité ni pathogénicité de *Bacillus subtilis* pour le nématode *Caenorhabditis elegans*. *Bacillus subtilis* n'est généralement pas considéré comme un pathogène des invertébrés autres que les arthropodes. **DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**		Numéros de l'ARLA 1623612, 1623613

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Microbes du sol	Toxicité aiguë	Aucune étude ni demande d'exemption n'a été présentée. Des données sur les effets ne sont pas requises, même si le produit vise à lutter contre des microorganismes nuisibles, car, *Bacillus subtilis* étant une composante normale du sol, il ne devrait nuire ni à des espèces de microorganismes d'importance environnementale ou économique, ni à des processus biogéochimiques où interviennent des microorganismes.		Sans objet
Végétaux				
Végétaux terrestres	Toxicité aiguë (*Glycine max* cultivar Asgrow A-3427)	Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*	$CE_{50} > 10^7$ spores/graine de semence CSEO = 10^7 spores/graine de semence Aucun effet attribuable au traitement n'a été observé. **NON TOXIQUE, NON PATHOGÈNE**	Numéro de l'ARLA 1623614
Organismes aquatiques				
Vertébrés				
Poissons d'eau douce	Toxicité aiguë (*Cyprinus carpio)*	Souche MBI 600 de *Bacillus subtilis*, 30 individus	$CE_{50} > 2{,}0 \times 10^8$ UFC/ml CSEO = $2{,}0 \times 10^8$ UFC/ml Aucun effet attribuable au traitement n'a été observé. **NON TOXIQUE, NON PATHOGÈNE**	Numéro de l'ARLA 1623598
Poissons estuariens et marins	Présentation d'une demande d'exemption s'appuyant sur l'ubiquité dans l'environnement de *Bacillus subtilis*, dont les populations n'augmenteront pas significativement en raison de l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences et dont le potentiel de lessivage vers des milieux aquatiques devrait être minime, et sur l'absence d'effet nocif des populations de *Bacillus subtilis* sur des poissons estuariens ou marins dans les études publiées. En fait, une étude publiée a montré que l'administration par voie alimentaire de *Bacillus subtilis* à titre de probiotique potentiel à des dorades royales (*Sparus aurata* L.) n'a produit chez elles aucun effet toxique ou pathogène. **DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**			Numéros de l'ARLA 1623600, 1623599, 1623579, 1623605, 1623607, 1623608, 1623609, 1623612, 1623598

Organisme	Exposition	Substance à l'essai	Effets significatifs et commentaires	Référence
Invertébrés				
Arthropodes aquatiques	Présentation d'une demande d'exemption s'appuyant sur l'ubiquité dans l'environnement de *Bacillus subtilis*, dont les populations n'augmenteront pas significativement en raison de l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences et dont le potentiel de lessivage vers des milieux aquatiques devrait être minime, et sur l'absence d'effet nocif des populations de *Bacillus subtilis* sur des arthropodes aquatiques dans les études publiées. **DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**			Numéros de l'ARLA 1623610, 1623605, 1623606, 1623607, 1623608, 1623609, 1623612, 1623598
Végétaux				
Végétaux aquatiques	Présentation d'une demande d'exemption s'appuyant sur l'ubiquité dans l'environnement de *Bacillus subtilis*, dont les populations n'augmenteront pas significativement en raison de l'utilisation de l'AMLA pour traiter des semences et dont le potentiel de lessivage vers des milieux aquatiques devrait être minime, et sur l'absence d'effet nocif des populations de *Bacillus subtilis* sur des végétaux aquatiques dans les études publiées. **DEMANDE D'EXEMPTION ACCEPTÉE**			Numéros de l'ARLA 1623615, 1623598, 1623605, 1623607, 1623608, 1623609, 1623614, 1623579

Tableau 8 Autres produits homologués pour réprimer/supprimer *Rhizoctonia* et *Fusarium* sur les semis de canola

Matière active	Préparation commerciale	Maladies combattues	Classement du fongicide	
			Groupe	Mode d'action
Iprodione	Foundation Lite, Nisso Foundation Lite	Fonte des semis et pourridié	M	Sites multiples
Thirame	Foundation Lite, Nisso Foundation Lite	Fonte des semis et pourridié	M	Sites multiples
Azoxystrobine	Dynasty 100FS	Pourriture des semences, fonte et brûlure des semis	11	Respiration
Fludioxonil	Maxim 480FS	Pourriture des semences, fonte et brûlure des semis	12	Transduction de signaux
Trifloxystrobine	Trilex FS	Pourriture des semences, fonte des semis avant et après la levée	11	Respiration
Métalaxyl	Apron FL, Allegiance FL,	Pourriture des semences, brûlure des semis	4	Synthèse des acides nucléiques
Carbathiine	Vitavax RS, Gaucho CS FL, Prosper FL, Prosper T 200, Prosper FX	Pourriture des semences, fonte et brûlure des semis, et	7	Respiration

		pourridié en début de saison		
Thirame	Vitavax RS, Gaucho CS FL, Prosper FL, Prosper T 200, Prosper FX	Pourriture des semences, fonte et brûlure des semis, et pourridié en début de saison	M	Sites multiples
Métalaxyl	Proposer FL, Prosper T 200, Prosper FX	Pourriture des semences, fonte et brûlure des semis, et pourridié en début de saison	4	Synthèse des acides nucléiques
Difénoconazole	Helix, Helix XTra, Tribune	Maladies des plantules	3	Transduction de signaux
Métalaxyl-M et isomère-S	Helix, Helix XTra, Tribune	Maladies des plantules	4	Synthèse des acides nucléiques
Fludioxonil	Helix, Helix XTra, Tribune	Maladies des plantules	12	Transduction de signaux

Tableau 9 Allégations d'utilisation proposées sur l'étiquette par le demandeur et commentaires sur leur acceptabilité

Allégation proposée sur l'étiquette	Allégation corroborée
Proposition Le traitement des semences à une dose de 160 ml d'Integral™ par 100 kg de semences réprime les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis et pourridié) de canola causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp.	Corroboration Le traitement des semences à une dose de 160 ml de biofongicide liquide Integral™ par 100 kg de semences supprime partiellement les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis et pourridié) de canola causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp.
Proposition Le traitement des semences à une dose de 160 ml par 100 kg de semences d'Integral™, mélangé en cuve avec du Helix, du Helix XTra ou du Prosper FL à la dose indiquée sur l'étiquette, réprime les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis et pourridié) de canola causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp.	Corroboration Le traitement des semences à une dose de 160 ml par 100 kg de semences de biofongicide liquide Integral™, mélangé en cuve avec le traitement de semences liquide Helix ou Helix Xtra ou la suspension insecticide-fongicide pour le traitement des semences Prosper FL à la dose indiquée sur l'étiquette, supprime les maladies des plantules (pourriture des semences, fonte et brûlure des semis et pourridié) de canola causées par *Rhizoctonia* spp. et *Fusarium* spp.

Références

A. Liste d'études et de renseignements présentés par le titulaire

1.0 Chimie

La matière active, ses propriétés et ses utilisations

PMRA 1623559 2008, Bacillus subtilis Strain MBI 600 Technical, DACO: M1.1

PMRA 1623560 2008, International regulatory status of the MPCA and EP, DACO: M1.3

PMRA 1622697 2008, INTEGRAL, DACO: M1.1

PMRA 1711294 2009, INTEGRAL, DACO: M1.1

PMRA 1622698 2008, Product Profile and Proposed Use Pattern, DACO: M1.2

PMRA 1739529 2009, Clarification of Intended Use Pattern for Integral Seed Treatment, DACO: M1.2

PMRA 1622699 2008, International regulatory status of the MPCA and EP, DACO: M1.3

Méthodes d'analyse

PMRA 1623564 2008, Product Characterization Table, DACO:M2.1,M2.2,M2.3,M2.4,M2.5,M2.6

PMRA 1623566 2008, Storage Stability of Technical Grade Bacillus subtilis, strain MBI600, DACO: M2.11

PMRA 1623567 2008, Summary of Physical and Chemical Properties (Bacillus subtilis, Souche MBI 600 Technical), DACO: M2.12

PMRA 1623568 De Lucca, A. J., and Walsh, T. J., 2000, Antifungal peptides: Origin, activity, and therapeutic potential, DACO: M2.14

PMRA 1623569 Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006, Biosurfactants: potential applications in medicine, DACO: M2.14

PMRA 1623570 Banerjee, P. C., 1977, Lytic Effect of Mycobacillin and Its Derivatives on Erythrocytes, DACO: M2.14

PMRA 1623571 Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005, Mycosubtilin Overproduction by Bacillus subtilis BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities

PMRA 1623572 Katz, E., and Demain, A. L., 1977, The Peptide Antibiotics of Bacillus: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions, DACO: M2.14

PMRA 1623573 Canadian Intellectual Property Office, 1993, Canadian Patent Database Patent: CA 1324099, DACO: M2.6

PMRA 1623576 Canadian Intellectual Property Office, 1996, Canadian Patent Database Patent: CA 1337935, DACO: M2.6

PMRA 1623577 2005, Identification of MBI600 by 16S rRNA gene sequence, DACO: M2.7.1

PMRA 1623578 1990, Study, Identification of Microorganisms, DACO: M2.7.1

PMRA 1623579	2005, Review of Literature on Occurrence and Persistence of the Bacterium Bacillus subtilis, DACO: M2.7.2,M8.0,M9.0
PMRA 1623580	2008, Manufacturing Process for Bacillus subtilis strain MBI600 Technical Grade Active Ingredient, DACO: M2.10.3,M2.8,M2.9.3 CBI
PMRA 1623581	2008, Product Specifications for Bacillus subtilis souche MBI 600 Technical Grade Active Ingredient, DACO: M2.9.1 CBI
PMRA 1623582	2007, Bacillus Spore Count Analysis, DACO: M2.10.1,M2.9.2 CBI
PMRA 1711307	2009, Routine Quality Control Analysis of Bacillus subtilis strain MBI600 in Technical Grade material, DACO: M2.9.2 CBI
PMRA 1762433	2009, Bacillus subtilis strain MBI600 Preservation and Long Term Storage at Nottingham University School of Agriculture, DACO: M2.7.1,M2.8
PMRA 1762434	2009, Clarification related to methods for confirmation of the identity of Bacillus subtilis MBI 600, DACO: M2.7.1,M2.8
PMRA 1622711	2008, Product Characterization Table, DACO: M2.1,M2.2,M2.3,M2.4,M2.5,M2.6
PMRA 1622720	2007, Bacillus Spore Count Analysis, DACO: M2.10.1,M2.9.2 CBI
PMRA 1622712	2008, CERTIFICATE OF ANALYSIS, DACO: M2.10.2 CBI
PMRA 1762424	2009, Integral Biological Fungicide-Clarification on the analysis for microbial contaminants, DACO: M2.10.2
PMRA 1622721	2008, Summary - Unintentional Ingredients; Analysis for Other Unintentional Ingredients (INTEGRAL), DACO: M2.10.3,M2.9.3 CBI
PMRA 1622713	2008, Study to Evaluate the Stability of Integral on Canola Seed in Combination with Common Seed Treatments - Helix Xtra or Prosper FL, DACO: M2.11
PMRA 1622714	2008, Study to Evaluate the Stability of Integral on Canola Seed in Combination with the Common Seed Treatment - Helix XTra, DACO: M2.11
PMRA 1622715	2008, Shelf Life Evaluation of Integral Liquid Product, DACO: M2.11
PMRA 1622716	2008, Summary of Physical and Chemical Properties (INTEGRAL), DACO: M2.12
PMRA 1622717	Canadian Intellectual Property Office, 1993, Canadian Patent Database Patent: CA 1324099, DACO: M2.6
PMRA 1622718	Canadian Intellectual Property Office, 1996, Canadian Patent Database Patent: CA 1337935, DACO: M2.6
PMRA 1622719	2008, Manufacturing Process for INTEGRAL Liquid Biological Fungicide, DACO: M2.8 CBI
PMRA 1762425	2009, Clarification related to methods for confirmation of the identity of Bacillus subtilis MBI 600, DACO: M2.8
PMRA 1711295	2009, Routine Quality Control Analysis of Bacillus subtilis strain MBI600 in Integral finished products, DACO: M2.9.2 CBI

2.0 Effets sur la santé les êtres humainse et animale

PMRA 1623584	2008, Summary of Human Health and Safety Testing, DACO: M4.1
PMRA 1623585	2008, Summary of Infectivity and Toxicity Testing, DACO: M4.2.1
PMRA 1623586	1989, Acute Oral Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of MBI600, DACO: M4.2.2
PMRA 1623587	1989, Acute Pulmonary Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of MBI600, DACO: M4.2.3
PMRA 1623588	2008, Summary of Acute Infectivity Testing (IV or IP), DACO: M4.3.1
PMRA 1623589	1989, Acute Intravenous Toxicity and Infectivity/Pathogenicity to Rats of MBI600, DACO: M4.3.2
PMRA 1623590	1989, Acute Dermal Toxicity to Rabbits of MBI600, DACO: M4.4,M4.5.2
PMRA 1623591	2008, Summary of Irritation Testing, DACO: M4.5.1
PMRA 1623592	1989, Delayed Contact Hypersensitivity in the Guinea-Pig with MBI600, DACO: M4.6
PMRA 1623593	1989, Primary Eye Irritation and Infectivity of MBI600, DACO: M4.9
PMRA 1622722	2008, Waiver Request - Acute Dermal Toxicity, DACO: M4.4
PMRA 1622723	2008, Waiver Request - Dermal Irritation Study, DACO: M4.5.2
PMRA 1622724	2008, Sensitization from exposure to Bacillus subtilis, souche MBI 600, DACO: M4.6

3.0 Environnement

PMRA 1623595	2008, Summary of Environmental Toxicity Testing, DACO: M9.1
PMRA 1623596	1993, Bacilus subtilis Strain MBI 600: An Avian Oral Pathogenicity and Toxicity Study in the Bobwhite, DACO: M9.2.1
PMRA 1623597	2008, Waiver request - Avian Pulminary, Inhalation or Injection, DACO: M9.2.2
PMRA 1623598	1997, Toxicity study of MBI-600 on carp (Cyprinus carpio), DACO: M9.4.1
PMRA 1623599	Salinas, I., Cuesta, A., Estaban, M.A., Meseguer, J., 2004, Dietary administration of Lactobacillus delbrueckii and Bacillus subtilis, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses, DACO: M9.4.2
PMRA 1623600	2008, Waiver Request - Estuarine or Marine Fish, DACO: M9.4.2
PMRA 1623601	Dedej, S., Delaplane, K. S., Scherm, H., 2004, Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent Bacillus subtilis to blueberry flowers to suppress mummy berry disease, DACO: M9.5.1
PMRA 1623602	1997, Studies on the Effect of Microbial Pesticides on Environmental Organisms: Effect of IK-1080 WP on honeybee, DACO: M9.5.1
PMRA 1623603	1997, Studies on the Effect of Microbial Pesticides on Environmental Organisms: Effect of IK-1080 WP on Off-target Insects, DACO: M9.5.1

PMRA 1623604 1996, Studies on the Effect of Microbial Pesticides on Environmental Organisms: Effect of IK-1080 WP on Silkworm Larvae, DACO: M9.5.1

PMRA 1623605 Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T., Yoshikawa, S., 1999, Characterization of Bacillus strains of marine origin, DACO: M9.5.2

PMRA 1623606 Vaseeharan, B. and Ramasamy, P., 2002, Control of pathogenic Vibrio spp. by Bacillus subtilis BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp Penaeus monodon, DACO: M9.5.2

PMRA 1623607 Liang, L. N., Sinclair, J. L., Mallory, L. M. and Alexander M., 1982, Fate in Model Ecosystems of Microbial Species of Potential Use in Genetic Engineering, DACO: M9.5.2

PMRA 1623608 Patnayak, S and Sree, A., 2005, Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA, DACO: M9.5.2

PMRA 1623609 Arellano-Carbajal, F., and Olmos-Soto, J., 2002, Thermostable a-1,4- and a-1,6-glucosidase enzymes from Bacillus sp. isolated from a marine environment, DACO: M9.5.2

PMRA 1623610 2008, Waiver Request - Aquatic Arthropods, DACO: M9.5.2

PMRA 1623611 Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., Murray, B. E., Calderwood, S. B. and Ausubel, F. M., 2001, A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors, DACO: M9.6

PMRA 1623612 Hill, I. R. and Gray, T. R. G., 1967, Application of the Fluorescent-Antibody Technique to an Ecological Study of Bacteria in Soil, DACO: M9.6

PMRA 1623613 2008, Waiver request - Non-arthropods invertebrates, DACO: M9.6

PMRA 1623614 1991, Evaluation of Bacillus subtilis MBI600 (ATCC N. SD-1414) for Its Effect on Soybeans (Glycine Max), DACO: M9.8.1

PMRA 1623615 2008, Waiver Request - Aquatic Plants, DACO: M9.8.2

4.0 Valeur

PMRA 1622700 2008, Value Summary - Information Document (INTEGRAL), DACO: M10.1

PMRA 1622701 2008, Potential of *Bacillus subtilis* isolate MBI 600 for inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* spp., DACO: M10.2.1

PMRA1622702 2008, Information Document Recommended Application Rate for Integral, DACO: M10.2.1

PMRA 1622703 2008, Potential for integrated biological and chemical control of seedling rot and preemergence damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* spp. in canola with *Bacillus subtilis* isolate MBI 600 and Prosper, DACO: M10.2.1,M10.3.1,M10.3.2.1,M10.3.

PMRA 1622704 2008, *Bacillus subtilis* strain MBI600 Biological Seed Treatment for Canola, DACO: M10.2.2

PMRA 1622705	2008, Field Evaluation of integrated biological and chemical control of the seedling disease complex in canola caused by *Rhizoctonia* solani and *Fusarium* spp. with Integral (*Bacillus subtilis*, strain MBI 600) in combination with Helix XTra or Prosper
PMRA 1622706	2008, Integral (*Bacillus subtilis*, strain MBI 600) Seed Safety Study on 71-45 RR Canola 6 Month Interim Report, DACO: M10.3.1
PMRA 1622707	2008, Profile of the EP INTEGRAL, DACO: M10.4.1
PMRA 1622708	2008, Nature and Economics of the Disease Problem in Canada, DACO: M10.4.2
PMRA 1622709	2008, Current Crop Protection Tools and Practices, DACO: M10.4.3
PMRA 1622710	2008, Contribution to Integrated Pest Management Practices, DACO: M10.4.4
PMRA 1711296	2009, Field Evaluation of integrated biological and chemical control of the seedling disease complex in canola caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* spp. with *Bacillus subtilis* (strain MBI 600) in combination with Helix XTra or Prosper Seed Treatment 2008 Summary of results, DACO: M10.2.2
PMRA 1711298	2009, Bioactivity Field Evaluation of Integral (*Bacillus subtilis*, strain MBI 600) in combination with Helix Seed Treatment on Canola 2005, DACO: M10.2.2
PMRA 1711299	2009, Field Evaluation of integrated biological and chemical control of the seedling disease complex in canola caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* spp. with *Bacillus subtilis* (strain MBI 600) in combination with Helix XTra or Prosper Seed Treatm
PMRA 1739528	2009, Response to PMRA Deficiency Letters, DACO: 0.8
PMRA 1739530	2009, Value of Integral to Canadian Canola Production, DACO: M10.1
PMRA 1739531	2009, Summary of Published Research Demonstrating Increased Efficacy of *Bacillus subtilis Rhizobacteria*, Compared to Fungicides in Reducing Damage Caused by Plant Pathogens, DACO: M10.2.1,M10.2.2
PMRA 1739533	2009, *Bacillus subtilis* strain MBI600 Biological Seed Treatment for Canola - 2008, DACO: M10.2.2